

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 13 OCT 2000

WIPO PCT

JP00/6802

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年10月 1日

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第282120号

出願人

Applicant (s):

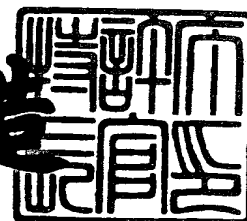
中外製薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 8月25日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3067112

【書類名】 特許願

【整理番号】 994124

【提出日】 平成11年10月 1日

【あて先】 特許庁長官 近藤 隆彦 殿

【国際特許分類】 A61K 39/395

【発明の名称】 血液凝固亢進状態が持続している疾患の予防又は治療剤

【請求項の数】 9

【発明者】

 【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社
社内

 【氏名】 斉藤 浩之

【特許出願人】

 【識別番号】 000003311

 【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100077517

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 石田 敬

 【電話番号】 03-5470-1900

【選任した代理人】

 【識別番号】 100092624

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 鶴田 準一

【選任した代理人】

 【識別番号】 100087871

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 福本 積

【選任した代理人】

 【識別番号】 100082898

【弁理士】

【氏名又は名称】 西山 雅也

【選任した代理人】

【識別番号】 100081330

【弁理士】

【氏名又は名称】 樋口 外治

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 036135

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9814920

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 血液凝固亢進状態が持続している疾患の予防又は治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヒト組織因子（ヒト T F）に対する抗体を含んで成る、血液凝固亢進状態が持続している疾患の予防又は治療剤。

【請求項 2】 前記抗体がポリクローナル抗体である、請求項 1 に記載の予防又は治療剤。

【請求項 3】 前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 に記載の予防又は治療剤。

【請求項 4】 前記抗体が組換え型抗体である、請求項 1 又は 3 に記載の予防又は治療剤。

【請求項 5】 前記抗体が改変抗体である、請求項 1 又は 4 に記載の予防又は治療剤。

【請求項 6】 前記改変抗体がキメラ抗体又はヒト型化抗体である、請求項 1, 4 又は 5 に記載の予防又は治療剤。

【請求項 7】 前記ヒト型化抗体が、バージョン b - b, i - b、又は i - b 2 のヒト型化抗体である、請求項 6 に記載の予防又は治療剤。

【請求項 8】 前記抗体が抗体修飾物である、請求項 1 又は 4 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の予防又は治療剤。

【請求項 9】 前記抗体修飾物が、抗体断片 F a b, F (a b')₂ もしくは F v、又はシングルチェーン F v (s c F v) である、請求項 8 に記載の予防又は治療剤。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は血液凝固亢進状態が継続している疾患の予防又は治療剤に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

血液凝固反応はセリンプロテアーゼ前駆体が次々に活性型プロテアーゼにより

活性化されて、最終的にトロンビンが生成することでフィブリン形成される反応である。血栓症は、各種の病的状態の進展に伴い血漿中の凝固・線溶系の変化、血小板や白血球、血管内皮細胞の機能が変化することで血液凝固反応が開始され過剰に亢進した結果として生じる。血液凝固反応の開始因子が組織因子（TF）である。

【0003】

急性心筋梗塞や不安定狭心症などの急性冠動脈症候群では、動脈硬化が進展した結果生じたプラーク内に多く存在するTFがプラークの破綻にともなって血液に露出することで血液凝固反応が開始される。また、敗血症や悪性腫瘍に随伴して生じる播種性血管内凝固症候群では、活性化された単球やマクロファージなどがTFを発現したり腫瘍細胞がTFを発現することで血液凝固反応を亢進させており、これが持続する。一旦、TFが血液に接触すると血液凝固反応は短時間の内に進み血栓を生成する。従って、血栓形成を予防するためには何時開始されるか分からない、あるいは常に生じている血液凝固反応を阻止する必要がある。従って、有効な抗血栓薬としては、血液凝固亢進状態の持続を阻止する医薬が必要である。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

従って本発明は、血液凝固状態が持続している疾患の新規な予防又は治療剤を提供しようとするものである。

【0005】

【課題を解決するための手段】

上記の課題を解決すべく種々検討した結果、本発明者らは、ヒト組織因子に対する抗体（抗ヒトTF抗体、又は抗TF抗体と称する場合がある）により、血液凝固亢進状態の持続を阻止することができることを見出した。

従って本発明は、抗ヒトTF抗体を含んで成る、血液凝固亢進状態が持続している疾患の予防又は治療剤を提供する。

【0006】

上記の抗ヒトTF抗体はポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体又は

改変抗体もしくは抗体修飾物であることができる。モノクローナル抗体は一般にハイブリドーマにより生産されるが遺伝子組換えにより製造することもでき、また改変抗体及び抗体修飾物は、通常、遺伝子組換えにより製造される。改変抗体としては、キメラ抗体、例えばヒト-マウスキメラ抗体が例示され、ヒト型化抗体としては、例えば後で具体的に説明するバージョン $b-b$, $i-b$ 、及び $i-b_2$ が挙げられる。抗体修飾物としては、 Fab , $F(ab')_2$, Fv などの抗体断片、及び抗体の可変領域を連結して 1 本鎖にしたシングルチェーン Fv ($scFv$ と称する) が挙げられる。

【0007】

【発明の実施の形態】

本発明において、血液凝固亢進状態とは、ヒト TF により惹起される身体状態であって、例えば、血小板数やフィブリノーゲン濃度の低下、可溶性フィブリンモノマー複合体 ($sFMC$) やトロンビン-アンチトロンビン III 複合体 (TAT) 濃度の上昇などの状態として現われる。

【0008】

本発明において使用する抗体としては、ヒト TF に基く血液凝固亢進状態の持続を阻止することができる抗体であればポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体のいずれでもよいが、モノクローナル抗体が好ましい。また、モノクローナル抗体に基くキメラ抗体、ヒト型化抗体、シングルチェーン Fv などを使用することもできる。ヒト型化抗体が特に好ましい。

【0009】

1. 抗ヒト TF 抗体

本発明で使用される抗ヒト TF 抗体は、ヒト TF に基く血液凝固亢進状態の持続を阻止する効果を有するものであれば、その由来、種類 (モノクローナル、ポリクローナル) および形状を問わない。

本発明で使用される抗ヒト TF 抗体は、公知の手段を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体として得ることができる。

【0010】

本発明で使用される抗ヒト TF 抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナ

ル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体は、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものを含む。この抗体はヒトTFと結合することにより、ヒトTFが血液凝固亢進の状態を惹起するのを阻害する抗体である。

【0011】

2. 抗体産生ハイブリドーマ

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、ヒトTF又はその一部分（断片）を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

【0012】

具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。

まず、抗体取得の感作抗原として使用されるヒトTFを、J.H.Morrissey ら、Cell, Vol.50, p.129-135 (1987)に開示されたヒトTF遺伝子／アミノ酸配列を発現することによって得る。すなわち、ヒトTFをコードする遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または培養上清中から目的のヒトTFタンパク質を公知の方法で精製する。この方法を、本明細書の参考例1に記載する。さらに、抗原として使用するヒトTFは参考例2に記載する方法によりヒト胎盤などのTF含有生物材料から抽出、精製して使用することもできる。

【0013】

次に、この精製ヒトTFタンパク質を感作抗原として用いる。あるいは、ヒトTFのC-末端側の膜貫通領域を除去した可溶性TFを例えば遺伝子組換えにより作製することもでき、これを感作抗原として使用することもできる。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター、あるいはウサギ、サ

ル等が使用される。

【0014】

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4-21日毎に数回投与する。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することもできる。

【0015】

このように哺乳動物を免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を採取し、細胞融合に付されるが、好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞として、哺乳動物のミエローマ細胞を用いる。このミエローマ細胞は、公知の種々の細胞株、例えば、P3 (P3x63Ag8.653) (Kearney, J.F. et al., J.Immunol. (1979) 123, 1548-1550), P3x63Ag8U.1 (Yelton, D.E. et al., Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7), NS-1 (Kohler.G. and Milstein, C.Eur.J.Immunol. (1976) 6, 511-519), MPC-11 (Margulies.D.H. et al., Cell (1976) 8, 405-415), SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270), F0 (de St.Groth, S.F. and Scheidegger, D.J., J.Immunol.Methods (1980) 35, 1-21), S194 (Trowbridge, I.S.J.Exp.Med. (1978) 148, 313-323), R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133) 等が好適に使用される。

【0016】

前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合は、基本的には公知の方法、たとえば、ミルステインらの方法 (Kohler.G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。

より具体的には、前記細胞融合は、例えば細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては、例えばポリエチレングリコール

(PEG)、センダイウイルス(HVJ)等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

【0017】

免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は任意に設定することができる。例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1-10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI 1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清(FCS)等の血清補液を併用することもできる。

【0018】

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め37℃程度に加温したPEG溶液(例えば平均分子量1000-6000程度)を通常30-60%(w/v)の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞(ハイブリドーマ)を形成する。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去する。

【0019】

このようにして得られたハイブリドーマは、通常を選択培養液、例えばHAT培養液(ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液)で培養することにより選択される。上記HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞(非融合細胞)が死滅するのに十分な時間(通常、数日~数週間)継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単一クローニングを行う。

【0020】

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球を*in vitro*でヒトTFに感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞と融合させ、ヒトTFへの結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる。(特公平1-59878号公報参照)。さら

に、ヒト抗体遺伝子の全てまたは一部のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となるヒトTFを投与して抗ヒトTF抗体産生細胞を取得し、これを不死化させた細胞からヒトTFに対するヒト抗体を取得してもよい（国際特許出願公開番号WO 94/25585号公報、WO 93/12227号公報、WO 92/03918号公報、WO 94/02602号公報参照）。

【0021】

このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

【0022】

モノクローナル抗体の製造の例を参考例2に具体的に記載する。この例においては、ATR-2, 3, 4, 5, 7及び8と称する6種類のモノクローナル抗体を得ており、いずれも本発明において使用することができるが、ATR-5が特に好ましい。

【0023】

3. 組換え型抗体

本発明では、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型のものを用いることができる（例えば、Vandamme, A.M. et al., Eur.J.Biochem. (1990) 192, 767-775, 参照）。

【0024】

具体的には、抗ヒトTF抗体を産生するハイブリドーマから、抗ヒトTF抗体の可変（V）領域をコードするmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法（Chirgwin, J.M. et al., Biochemistry (1

979) 18, 5294-5299)、A G P C 法 (Chomczynski, P. and Sacchi, N., Anal.Biochem. (1987) 162, 156-159)等により行って全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia製)等を使用して目的のmRNAを調製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia製)を用いることによりmRNAを直接調製することもできる。

【0025】

得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域のcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業社製)等を用いて行う。また、cDNAの合成および増幅を行うには、5'-AmplifINDER RACE Kit (Clontech製)およびPCRを用いた5'-RACE法 (Frohman, M.A. et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA (1988) 85, 8998-9002, Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932)等を使用することができる。

【0026】

得られたPCR産物から目的とするDNA断片を精製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。そして、目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法等により確認する。

目的とする抗ヒトTF抗体のV領域をコードするDNAを得たのち、これを、所望の抗体定常領域(C領域)をコードするDNAを含有する発現ベクターへ組み込む。

【0027】

本発明で使用される抗ヒトTF抗体を製造するには、抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより、宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させる。

抗体遺伝子の発現は、抗体重鎖(H鎖)または軽鎖(L鎖)をコードするDNAを別々に発現ベクターに組み込んで宿主細胞を同時形質転換させてもよいし、

あるいはH鎖およびL鎖をコードするDNAを単一の発現ベクターに組み込んで宿主細胞を形質転換させてもよい（WO 94/11523号公報参照）。

【0028】

また、組換え型抗体の産生には上記宿主細胞だけではなく、トランスジェニック動物を使用することができる。例えば、抗体遺伝子を、乳汁中に固有に産生される蛋白質（ヤギ β カゼインなど）をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギまたはその子孫が産生する乳汁から所望の抗体を得る。また、トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい（Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702）。

組換え抗体の製造方法の一例を参考例3に具体的に記載する。

【0029】

4. 改変抗体

本発明では、上記抗体のほかに、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ抗体、ヒト型化（Humanized）抗体を使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

キメラ抗体は、前記のようにして得た抗体V領域をコードするDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得られる。この既知の方法を用いて、本発明に有用なキメラ抗体を得ることができる。

【0030】

ヒト型化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称され、これは、ヒト以外の哺乳動物、例えばマウス抗体の相補性決定領域（CDR; complementarity determining region）をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている（欧州特許出願公開番号EP 125023号公報、WO 96/02576号公報参照）。

具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域（framework region; FR）とを連結するように設計したDNA配列を、CDR及びFR両方の末端領域にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてPCR法により合成する（WO 98/13388号公報に記載の方法を参照）。

【0031】

CDRを介して連結されるヒト抗体のフレームワーク領域は、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように、抗体の可変領域におけるフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい（Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856）。

キメラ抗体及びヒト型化抗体のC領域には、ヒト抗体のものが使用され、例えばH鎖では、C γ 1, C γ 2, C γ 3, C γ 4を、L鎖ではC κ , C λ を使用することができる。また、抗体またはその産生の安定性を改善するために、ヒト抗体C領域を修飾してもよい。

【0032】

キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物由来抗体の可変領域とヒト抗体由来の定常領域とからなる。一方、ヒト型化抗体は、ヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性決定領域と、ヒト抗体由来のフレームワーク領域およびC領域とからなる。ヒト型化抗体はヒト体内における抗原性が低下されているため、本発明の治療剤の有効成分として有用である。

キメラ抗体の作製方法は参考例4に具体的に記載する。

また、ヒト型化抗体の作製方法を参考例5に具体的に記載する。この参考例においては、ヒト型化重鎖（H鎖）可変領域（V領域）として、表1及び表2に示すアミノ酸配列を有するバージョンa, b, c, d, e, f, g, h, i, j, b1, d1, b3及びd3を用いた。

【0033】

【表 1】

表 1

H鎖V領域のアミノ酸配列

	FR1	2	3	CDR1	4	FR2	5	6	CDR2
L39130(a)	12345678901234567890	1234567890	1234567890	12345	67890123456789	012A3456789012345			
Z34963(b)	QVQLLESGAVLARPGTSVKISCKASGFNIK	DYYMH	WVKRPGGLEWIG	GNDPANGHSMYDPKPPQG					
M30885(c)									
M62723(d)									
Z80844(e)									
L04345(f)									
S78322(g)									
Z26827(h)									
U95239(i)									
L03147(j)									
P01742(b1)									
P01742(d1)									
Z80844(b3)									
Z80844(d3)									

【0034】

【表 2】

表 2

H鎖V領域のアミノ酸配列（表1の続き）

	7	8	9	10	11
L39130(a)	67890123456789012ABC345678901234	56789012	3456789012	3456789012	34567890123
Z34963(b)	RAKLTAATSASIAYLEFSSLTNEDSAVYYCAR	DSGYAMDY	WGQGT	TLTV	TVSS
M30885(c)	-VTI--D--TNT--M-L--RS--T-I--				
M62723(d)	-VTMLVD--KNQFS--RL--V-AA-T--				
Z80844(e)	-VTI--DE-T-T--M-L--RS--F--				
L04345(f)	-VSI--DE-TK--M-LN--RS--T--F--				
S78322(g)	-VTI--DT-T-T--M-LR--RSD-T--				
Z26827(h)	K-T---DE-S-T--MQL--RS--S--				
U95239(i)	-VTMS-DK-S-A---QWT--KAS-T-I--F--				
L03147(j)	-VTI--D--T-TVPM-L--RS--T--				
P01742(b1)	-VTF--D--NT--M-LR--RSA-T--				
P01742(d1)	-VTI--D--TNT--M-L--RS--T-I--				
Z80844(b3)	-VTI--DE-T-T--M-L--RS--F--				
Z80844(d3)	-VTI--D--TNT--M-L--RS--T-I--				
	-VTI--DE-T-T--M-L--RS--F--				

【0035】

また、ヒト型化軽鎖（L鎖）V領域として、表3に示すアミノ酸配列を有するバージョンa, b, c, b1及びb2を用いた。

【0036】

【表 3】

表 3

L鎖V領域のアミノ酸配列

	FR1		CDR1		FR2	CDR2
	1	2	3	4	5	
	12345678901234567890123	45678901234	5678901234	567890123456789	0123456	
Z37332(a)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	KASQDIKSFLS	WYQQKPGKAPKLLIY	YATSLAD		
S68699(b)	-----	-----	-----	-----	-----	
P01607(c)	-----	-----	-----	-----	-----	
S65921(b1)	-----	-----	-F-----	-S--T--	-----	
X93625(b2)	-----	-----	-----	-E---S-	-----	

	FR3			CDR3	FR4
	6	7	8	9	10
	78901234567890123456789012345678	901234567	8901234567		
Z37332(a)	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	LQPEDFATYYC	LQHGESPYT	FGGGTKVEIK	
S68699(b)	-----	-Y-----	-----	-----	
P01607(c)	-----	-Y-----	-I-----	-----	
S65921(b1)	-----	-Y-----	-----	-----	
X93625(b2)	-----	-Y-----	-----	-----	

【0037】

そして、上記のH鎖V領域の種々のバージョンと、L鎖V領域の種々のバージョンを組合わせて抗原結合能、及びTF中和活性について評価した結果、参考例6及び参考例7に記載する通り、「H鎖V領域バージョン」-「L鎖V領域バージョン」として表示する場合「b-b」、「i-b」、及び「i-b2」が特に高活性を示した。なお、これらのヒト型化抗体の抗原結合能を図1に示し、ヒト

TF中和活性（TFのファクターX a 産生阻害活性）を図2に示し、ヒトTF中和活性（ファクターX結合阻害活性）を図3に示し、そしてヒトTF中和活性（TFの血漿凝固阻害活性）を図4に示す。

【0038】

5. 抗体修飾物

本発明で使用される抗体は、ヒトTFに結合し、ヒトTFの活性を阻害するかぎり、抗体の断片又はその修飾物であってよい。例えば、抗体の断片としては、Fab, F(ab')₂, Fv、またはH鎖若しくはL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv (scFv) が挙げられる。

【0039】

具体的には、抗体を酵素、例えばパパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、または、これらの抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M.S. et al., J.Immunol. (1994) 152, 2968-2976, Better, M. & Horwitz, A.H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Plueckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 497-515, Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1986) 121, 652-663, Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1986) 121, 663-669, Bird, R.E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137参照）。

【0040】

scFvは、抗体のH鎖V領域とL鎖V領域とを連結することにより得られる。このscFvにおいて、H鎖V領域とL鎖V領域は、リンカー、好ましくはペプチドリナーを介して連結される（Huston, J.S. et al., Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883）。scFvにおけるH鎖V領域およびL鎖V領域は、本明細書に抗体として記載されたもののいずれの由来であってもよい。V領域を連結するペプチドリナーとしては、例えばアミノ酸12-19残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

【0041】

scFvをコードするDNAは、前記抗体のH鎖またはH鎖V領域をコードするDNA、およびL鎖またはL鎖V領域をコードするDNAのうち、それらの配

列のうちの全部又は所望のアミノ酸配列をコードするDNA部分を鋳型とし、その両端を規定するプライマー対を用いてPCR法により増幅し、次いで、さらにペプチドリンカー部分をコードするDNA、およびその両端が各々H鎖、L鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合わせて増幅することにより得られる。

【0042】

また、一旦scFvをコードするDNAが作製されると、それらを含む発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いることにより、常法に従ってscFvを得ることができる。

これら抗体の断片は、前記と同様にしてその遺伝子を取得し発現させ、宿主により産生させることができる。本発明における「抗体」にはこれらの抗体の断片も包含される。

【0043】

抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール(PEG)等の各種分子と結合した抗ヒトTF抗体を使用することもできる。本発明における「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。なお、抗体の修飾方法はこの分野においてすでに確立されている。

【0044】

6. 組換え型抗体または改変抗体の発現および産生

前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させ、取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なプロモーター、発現させる抗体遺伝子、その3'側下流にポリAシグナルを機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーター/エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウイルス前期プロモーター/エンハンサー(human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer)を挙げることができる。

【0045】

また、その他に本発明で使用される抗体発現に使用できるプロモーター/エン

ハンサーとして、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス 40 (SV40) 等のウィルスプロモーター／エンハンサー、あるいはヒトエロンゲーションファクター 1 α (HEF1 α) などの哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサー等が挙げられる。

SV40 プロモーター／エンハンサーを使用する場合はMulliganらの方法 (Nature (1979) 277, 108-114) により、また、HEF1 α プロモーター／エンハンサーを使用する場合はMizushima らの方法 (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) により、容易に遺伝子発現を行うことができる。

【0046】

大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列及び発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて当該遺伝子を発現させることができる。プロモーターとしては、例えば lacZ プロモーター、araB プロモーターを挙げることができる。lacZ プロモーターを使用する場合はWardらの方法 (Nature (1989) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427) により、あるいは araB プロモーターを使用する場合はBetterらの方法 (Science (1988) 240, 1041-1043) により発現することができる。

【0047】

抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelB シグナル配列 (Lei, S.P. et al J.Bacteriol. (1987) 169, 4379-4383) を使用すればよい。そして、ペリプラズムに産生された抗体を分離した後、抗体の構造を適切に組み直して (refold) 使用する。

複製起源としては、SV40、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシバピローマウィルス (BPV) 等の由来のものを用いることができ、さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは、選択マーカーとしてアミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

【0048】

本発明で使用される抗体の製造のために、任意の発現系、例えば真核細胞又は原核細胞系を使用することができる。真核細胞としては、例えば樹立された哺乳類細胞系、昆虫細胞系、真糸状菌細胞および酵母細胞などの真菌細胞等が挙げられ、原核細胞としては、例えば大腸菌細胞等の細菌細胞が挙げられる。

好ましくは、本発明で使用される抗体は、哺乳類細胞、例えばCHO, COS、ミエローマ、BHK, Vero, HeLa細胞中で発現される。

【0049】

次に、形質転換された宿主細胞をin vitroまたはin vivoで培養して目的とする抗体を産生させる。宿主細胞の培養は公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM, MEM, RPMI 1640, IMDMを使用することができ、牛胎児血清(FCS)等の血清補液を併用することもできる。

【0050】

7. 抗体の分離、精製

前記のように発現、産生された抗体は、細胞、宿主動物から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用される抗体の分離、精製はアフィニティークラムを用いて行うことができる。例えば、プロテインAカラムを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose F.F. (Pharmacia 製) 等が挙げられる。その他、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、上記アフィニティークラム以外のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせることにより、抗体を分離、精製することができる (Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。

【0051】

8. 血液凝固亢進状態の持続の阻止作用の測定

本発明の血液凝固亢進状態が持続している疾患の予防又は治療の薬効の試験は、新規な動物モデル系が必要であり、この評価方法の詳細は、本件と同一出願人の「持続的血液凝固亢進動物モデル及びその作製方法」と題する特許出願の明細書に記載されている。その評価方法の具体例を本件明細書に実施例1として記載

する。

【0052】

また、上記のヒト型化抗ヒトTF抗体バージョン「i-b2」を用いた結果を実施例2及び図11～13に示す。この実験においては、実施例1に示す動物モデル系において、ヒトTF遺伝子を含有する腫瘍細胞を移植したマウスの血小板数が該腫瘍細胞を移植しなかったマウスの血小板数に比べて約半分に減少した後（移植後5～6週間）1mg/kgのヒト型化抗ヒトTF抗体バージョン「i-b2」を1週間に1回静脈内に反復投与したところ、投与開始後3週間で実験を終了するまで、血小板数は腫瘍を移植しなかったマウスの血小板数レベルに維持された。

【0053】

また、本発明のヒト型化抗ヒトTF抗体の投与により可溶性フィブリンモノマー複合体（sFMC）及びトロンビン-アンチトロンビンIII複合体（TAT）濃度の上昇が抑制された。この結果、本発明の抗ヒトTF抗体の投与により血液凝固亢進状態の持続が阻止され、正常な状態が維持されることが確認された。

【0054】

9. 投与方法および製剤

本発明の治療剤は、血液凝固亢進状態が持続する疾患の、予防、治療又は改善を目的として使用される。

有効投与量は、一回につき体重1kgあたり0.001mgから1000mgの範囲で選ばれる。あるいは、0.01～100mg/kg、好ましくは0.1～10mg/kgの投与量を選ぶことができる。しかしながら、本発明の抗ヒトTF抗体を含有する治療剤はこれらの投与量に制限されるものではない。

【0055】

投与方法は特に限定されないが、静脈注射、点滴静脈注射等が好ましい。

本発明の抗ヒトTF抗体を有効成分として含有する治療剤は、常法にしたがって製剤化することができ（Remington's Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton, 米国）、医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。

【0056】

このような担体および医薬添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン（HSA）、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤等が挙げられる。

【0057】

実際の添加物は、本発明治療剤の剤型に応じて上記の中から単独で又は適宜組み合わせて選ばれるが、もちろんこれらに限定するものではない。例えば、注射用製剤として使用する場合、精製された抗ヒトTF抗体を溶剤、例えば生理食塩水、緩衝液、ブドウ糖溶液等に溶解し、これに吸着防止剤、例えばTween 80、Tween 20、ゼラチン、ヒト血清アルブミン等を加えたものを使用することができる。あるいは、使用前に溶解再構成する剤形とするために凍結乾燥したものであってもよく、凍結乾燥のための賦形剤としては、例えば、マンニトール、ブドウ糖等の糖アルコールや糖類を使用することができる。

【0058】

【実施例】

次に、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

実施例 1. 実験用マウスの作製

ヒト組織因子をコードする遺伝子（配列番号：103）を動物細胞用発現ベクターpCOS1に挿入したベクター（hTF-pCOS1）を制限酵素PruIで消化し、直鎖にしたものをヒト骨髓腫細胞株KPM2（FERM P-14170）にエレクトロポレーションにより導入した。

【0059】

なお、pCOS1はHEF-PMh-gr1（WO92/19759参照）か

ら、EcoRIおよびSmaI消化により抗体遺伝子を削除し、EcoRI-NotI-BamHI Adaptor (宝酒造) を連結することにより構築した。前記細胞株を、2mg/mLのG418を含有するRPMI1640 (20% FCS hIL-6: 4ng/ml 含有) 培地に培養し、増殖してきた細胞について、抗ヒト組織因子抗体 (American Diagnostica) を用いて、ヒト組織因子を発現する細胞をフローサイトメトリーにより確認した。これにより、ヒト組織因子遺伝子を導入した細胞株KPM2/TF226を得た。

【0060】

前記ヒト組織因子遺伝子を導入する前の親株 (KPM2/parent) 及び遺伝子を挿入した株KPM2/TF226を、4ng/mLのヒトIL-6及び20%ウシ胎児血清を含むRPMI-1640において培養した。こうして増殖させたKPM2/TF226細胞及び親株KPM2/parent細胞を別々のSCIDマウス (入手先: 日本クレア、雄、7週齢、体重平均約22g) の側腹部の皮下に 1×10^7 個移植し、経時的に、腫瘍体種、血液中のヒト組織因子濃度、血小板数、フィブリノーゲン濃度、可溶性フィブリンモノマー複合体 (sFMC) 濃度、及びトロンビン-アンチトロンビンIII複合体 (TAT) 濃度の変化を調べた。

【0061】

この結果、図5に示す通り、いずれのマウスにおいても腫瘍体積は経時的に増加した。しかしながら、図6に示す通り、ヒト組織因子の血中濃度は、ヒト組織因子遺伝子が導入された細胞を移植したマウスにおいては経時的に上昇したが該遺伝子が導入されていない細胞を移植したマウスにおいては全く上昇しなかった。また、図7及び図8に示す通り、ヒト組織因子遺伝子が導入された細胞を移植したマウスにおいては、それぞれ血小板及びフィブリノーゲンが経時的に減少し、これらの血液凝固成分が消耗されたことが示された。これに対して、ヒト組織因子遺伝子が導入されていない細胞を移植したマウスにおいては、これらの血液凝固成分の減少 (消耗) は生じなかった。

【0062】

また、図9及び図10に示す通り、それぞれ可溶性フィブリンモノマー複合体

(sFMC) 及びトロンビン-アンチトロンビンIII 複合体 (TAT) の血中濃度は、ヒト組織因子遺伝子が導入された細胞を移植したマウスにおいては経時的に上昇し、血液凝固亢進状態が進行していることが示された。これに対して、ヒト組織因子遺伝子が導入されていない細胞を移植したマウスにおいては、前記の血液凝固-関連成分濃度の上昇は見られなかった。

以上の結果、ヒト組織因子遺伝子が導入された細胞を移植したマウスにおいては、血液凝固亢進状態が長期間持続していることが確認され、本発明の動物が、持続的凝固亢進モデル動物として有用であることが確認された。

【0063】

実施例 2.

実施例 1 に記載のモデルにおけるヒト型化抗ヒトTF抗体バージョン「i-b2」の効果を検討した。KPMM2/TF226をSCIDマウス（日本クレア、雄、7週齢、体重平均約22g）に移植した5～6週間後に血小板数が腫瘍非移植群の約半分ぐらいになり、凝固亢進状態の持続が確認されたので、移植後45日後より1mg/kgのhATR-5を1週間に1回静脈内投与した。その結果、ヒト型化抗ヒトTF抗体バージョン「i-b2」投与の3日後には血小板数は腫瘍非移植群以上にまで回復し、投与開始から実験を終了した3週間目までの間、血小板数は腫瘍非移植群のレベルを維持した（図11）。

【0064】

また、3回目のヒト型化抗ヒトTF抗体バージョン「i-b2」投与の6日目に血液中の可溶性フィブリンモノマー複合体 (sFMC) 濃度およびトロンビン-アンチトロンビンIII 複合体 (TAT) 濃度を測定したところ、抗体投与によりこれらの上昇は抑制されていた（図12および図13）。これらの結果から、ヒト型化抗ヒトTF抗体バージョン「i-b2」は凝固亢進状態が長期間持続するモデルにおいて、週1回の投与で凝固状態を安定して正常レベルに維持する作用を有していた。

【0065】

参考例 1. 可溶型ヒトTFの作製法

可溶型ヒトTF (shTF) は以下のように作製した。

ヒトTFの貫通領域(220番目のアミノ酸)以下をFLAGペプチドM2に置換したものをコードする遺伝子を、哺乳動物細胞用の発現ベクター(ネオマイシン耐性遺伝子、DHFR遺伝子を含む)に挿入し、CHO細胞に導入した。ヒトTFのcDNA配列はJames H. Morrisseyらの報告(Cell(1987) 50, 129-135)を参考にした。この可溶型ヒトTFの遺伝子配列とアミノ酸配列を配列番号101及び102に示した。G418により薬剤セレクションし、発現細胞を選抜し、さらにメトトレキサートで発現増幅をかけ、shTF発現細胞を樹立した。

【0066】

この細胞を無血清培地CHO-S-SFMII(GIBCO)で培養し、shTFを含む培養上清を得た。同容量の40mMトリス塩酸緩衝液(pH8.5)で2倍に希釈し、20mMトリス塩酸緩衝液(pH8.5)で平衡化したQ-Sepharose Fast Flowカラム(100mL, Pharmacia Biotech)に添加し、0.1M NaClを含む同緩衝液で洗浄後、NaClの濃度を0.3Mとし、shTFをカラムから溶出した。得られたshTF画分に終濃度2.5Mとなるように硫酸アンモニウムを加え、遠心操作(10,000rpm, 20分)により夾雑蛋白質を沈殿させた。上清をButyl TOYOPEARL(30mL, TOSOH)に添加し、2.5Mの硫酸アンモニウムを含む50mMトリス塩酸緩衝液(pH6.8)で洗浄した。

【0067】

50mMトリス塩酸緩衝液(pH6.8)中、硫酸アンモニウム濃度を2.5Mから0Mまで直線的に下げ、shTFを溶出させた。shTFを含むピーク画分をCentri-Prep 10(アミコン)で濃縮した。150mM NaClを含む20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.0)で平衡化したTSK gel G3000 SWGカラム(21.5×600mm, TOSOH)に濃縮液を添加し、shTFのピーク画分を回収した。これを0.22 μ mのメンブランフィルターで濾過滅菌し、可溶型ヒトTF(shTF)とした。試料の吸光度280nmのモル吸光係数を $\epsilon=40,130$ 、分子量を43,210として、試料の濃度を算出した。

【0068】

参考例 2. 抗TFモノクローナル抗体の作製

1. ヒトTFの精製

ヒト胎盤からのTFの精製は、Itoらの方法(Ito, T.ら J. Biochem. 114, 691-696, 1993) に準じて行った。すなわち、ヒト胎盤を10 mM塩化ベンザミジン、1 mMフッ化フェニルメチルスルフォニル、1 mMジイソプロピルフルオロフォスフェートおよび0.02%アジ化ナトリウムを含むトリス緩衝生理食塩液(TBS, pH 7.5) 中でホモジナイズ後、沈殿を冷アセトンで脱脂し、得られた脱脂粉末を2% Triton X-100を含む上記緩衝液に懸濁してTFを可溶化した。

【0069】

この上清から Concanavalin A-Sepharose 4Bカラム(Pharmacia) および抗TF抗体を結合させた Sepharose 4Bカラム(Pharmacia) を用いてアフィニティークロマトグラフィーを行い、精製TFを得た。これを限外濾過膜(PM-10, Amicon) で濃縮し、精製標品として4℃で保存した。

精製標品中のTF含量は、市販の抗TFモノクローナル抗体(American Diagnostica) とポリクローナル抗体(American Diagnostica) を組合せた Sandwich ELISAで、組換え型TFを標準にして定量した。

また精製標品の純度は、4-20%濃度勾配ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGEしたものを銀染色することで確認した。

【0070】

2. 免疫とハイブリドーマの作製

精製ヒトTF(約70 μ g/ml) を等容量の Freund の完全アジュバント(Difco) と混合し、乳化した後、5週齢の Balb/c 系雄性マウス(日本チャールスリバー) の腹部皮下に、TFとして10 μ g/マウスとなるように免疫した。初回免疫の12, 18及び25日後には Freund の不完全アジュバントと混合したTFを5 μ g/マウスとなるように皮下に追加免疫し、最終免疫として32日目にPBSで希釈したTF溶液を5 μ g/マウスで腹腔内投与した。

【0071】

最終免疫の3日後に4匹のマウスから脾細胞を調製し、細胞数で約1/5のマウスミエローマ細胞株P3U1とポリエチレングリコール法を用いて融合させた。融合細胞を10%ウシ胎仔血清を含むRPMI-1640培地（以下RPMI-培地とする）(Lifetech oriental)に懸濁し、96穴プレートに1匹のマウスにつき400穴播種した。融合後、1, 2, 3, 5日目に培地の半量をHAT（大日本製薬）およびcondimed H1(Boehringer Mannheim GmbH)を含むRPMI-培地（以下HAT-培地とする）に交換することで、ハイブリドーマのHAT選択を行った。

【0072】

下記のスクリーニング法で選択したハイブリドーマは2回の限界希釈を行うことでクローン化した。

限界希釈は、96穴プレート2枚に一穴あたり0.8個の細胞を播種した。検鏡により単一コロニーであることが確認できた穴について、下記に示したTF結合活性とTF中和活性の測定を行いクローンを選択した。得られたクローンはHAT-培地からRPMI-培地に馴化し、馴化による抗体産生能の低下が無いことを確認したうえで、再度限界希釈を行い、完全なクローン化を行った。以上の操作により、TF/ファクターVIIa複合体とファクターXとの結合を強く阻害する抗体6種（ATR-2, 3, 4, 5, 7及び8）を産生するハイブリドーマが樹立できた。

【0073】

3. 腹水の作製および抗体の精製

樹立したハイブリドーマの腹水の作製は常法に従って行った。すなわち、in vitroで継代したハイブリドーマ 10^6 個を、あらかじめ鉱物油を2回腹腔内に投与しておいたBalb/c系雄性マウスの腹腔内に移植した。移植後1~2週目で腹部が肥大したマウスから腹水を回収した。

腹水からの抗体の精製は、Protein Aカラム（日本ガイシ）を装着したConSepLC100システム(Millipore)を用いて行った。

【0074】

4. Cell-ELISA

TFを高発現することで知られているヒト膀胱癌由来細胞株J82 (Fair D.S. ら、J.Biol.Chem., 262, 11692-11698, 1987) をATCCより導入し、RPMI-1640培地中、37℃、5%CO₂、100%湿度の条件で継代・維持した。

Cell-ELISA用プレートは、96穴プレートにJ82細胞を10⁵個/穴の濃度で播種し、上記条件で1日培養後、培地を除いてリン酸緩衝生理食塩液(PBS)で2回洗浄し、4%パラホルムアルデヒド溶液(PFA)を加えて氷冷下で10分静置することで固定化することによって作製した。PFAを除去し、PBSで洗浄後、1%BSAおよび0.02%アジ化ナトリウムを含むTris緩衝液(Blocking緩衝液)を加えて、使用時まで4℃で保存した。

【0075】

Cell-ELISAは以下のように行った。すなわち、上記のように作製したプレートからBlocking緩衝液を除去し、抗TF抗体溶液もしくはハイブリドーマ培養上清を加えて室温で1.5時間反応させた。0.05% Tween20を含むPBSで洗浄後、アルカリフォスファターゼを結合したヤギ抗マウスIgG(H+L)(Zymed)を1時間反応させ、洗浄後、1mg/mlのp-ニトロフェニルホスフェート二ナトリウム(Sigma)を添加して1時間後に405nmにおける吸光度を測定することで、J82細胞に結合した抗TF抗体量を定量した。

【0076】

5. ファクターXa活性を指標としたTF中和活性測定系

50μlの5mM CaCl₂ および0.1%ウシ血清アルブミンを含むトリス緩衝生理食塩液(TBS: pH7.6)に10μlのヒト胎盤由来トロンボプラスチン溶液(5mg/ml)(Thromborel S)(Boehring)と10μlのファクターVIIa溶液(82.5ng/ml)(American Diagnostica)を添加し、室温で1時間反応させることでTF/Factor VIIa複合体を形成させた後、10μlの所定濃度に希釈した抗TF抗体溶液もしくはハイブリドーマ培養上清および10μlのFactor X溶液(3.245μg/ml)(Celsus Laboratorise)を添加して45分間反応させ、0.5M EDTAを10μl添加することで反応を止めた。ここに2mM S-2222溶液(第一化学薬品)を50μl添加し、30分間の405nmにおける吸光度変化をもってTFのFactor Xa産生活性とした。この方法で

は、TF/Factor VIIa 複合体とFactor Xとの結合を阻害する抗体の活性は測定できる。

【0077】

6. 血漿凝固阻害活性測定系

市販の正常ヒト血漿（コージンバイオ）を用い、この100 μ lに適当に希釈した抗TF抗体溶液50 μ lを混和して37℃で3分間反応させた後、50 μ lのヒト胎盤由来トロンボプラスチン溶液（1.25mg/ml）を添加し、血漿が凝固するまでの時間を血漿凝固時間測定装置（CR-A:Amelung）で測定した。

7. 抗体のアイソタイプの決定

ハイブリドーマの培養上清もしくは精製抗体について、マウスモノクローナル抗体アイソタイピングキット（Amersham社製）を用いて抗体のアイソタイプを確認し、結果を下に示した。

【0078】

【表4】

表 4

抗TFモノクローナル抗体のイムノグロブリンアイソタイプ

ATR-2	IgG1, k
ATR-3	IgG1, k
ATR-4	IgG1, k
ATR-5	IgG1, k
ATR-7	IgG2a, k
ATR-8	IgG2a, k

【0079】

参考例 3. ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体のV領域をコードするDNAのクローニング

(1) mRNAの調製

参考例2で得たハイブリドーマATR-5（IgG1 κ ）からmRNAをQuic

k Prep mRNA Purification Kit(Pharmacia Biotech) を用いて調製した。キット添付の処方に従い、それぞれのハイブリドーマ細胞を抽出緩衝液で完全にホモジナイズし、オリゴ(dT)-セルローススパンカラムにてmRNAを精製し、エタノール沈殿を行った。mRNA沈殿物を溶出緩衝液に溶解した。

【0080】

(2) マウス抗体V領域をコードする遺伝子のcDNAの作製及び増幅

(i) H鎖V領域cDNAのクローニング

ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域をコードする遺伝子のクローニングは、5'-RACE法(Frohman, M.A. et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 85, 8998-9002, 1988; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acid Res. 17, 2919-2932, 1989)により行った。5'-RACE法にはMarathon cDNA Amplification Kit(CLONTECH)を用い、操作はキット添付の処方に従って行った。

【0081】

前記のようにして調製したmRNA約1 μ gを鋳型として、キット添付のcDNA synthesis primerを加え、逆転写酵素と42℃、60分間反応させることによりcDNAへの逆転写を行った。これをDNAポリメラーゼI、DNAリガーゼ、RNase Hで16℃、1.5時間、T4 DNAポリメラーゼで16℃、45分間反応させることにより、2本鎖cDNAを合成した。2本鎖cDNAをフェノール及びクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿により回収した。

【0082】

T4 DNAリガーゼで16℃で一夜反応することにより、2本鎖cDNAの両端にcDNAアダプターを連結した。反応混合液は10mM Tricine-KOH(pH8.5)、0.1mM EDTA溶液で50倍に希釈した。これを鋳型としてPCRによりH鎖V領域をコードする遺伝子を増幅させた。5'-側プライマーにはキット添付のアダプタープライマー1を、3'-側プライマーにはMHC-G1プライマー(配列番号1)(S.T.Jones, et al., Biotechnology, 9, 88-89, 1991)を使用した。

【0083】

ATR-5抗体H鎖V領域に対するPCR溶液は、100 μ l中に120mM

Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM KCl、6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、0.2 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1 mM MgCl_2 、2.5 ユニットのKOD DNAポリメラーゼ(東洋紡績)、30~50 pmoleのアダプタープライマー1並びにMHC-G1プライマー、及びcDNAアダプターを連結したcDNAの反応混合物1~5 μl を含有する。

PCRはいずれもDNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer)を用い、94℃にて30秒間、55℃にて30秒間、74℃にて1分間の温度サイクルで30回行った。

【0084】

(ii) L鎖V領域cDNAのクローニング

ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域をコードする遺伝子のクローニングは、5'-RACE法(Frohman, M.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002, 1988; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acid Res. 17, 2919-2932, 1989)により行った。5'-RACE法にはMarathon cDNA Amplification Kit (CLONTECH)を用い、操作はキット添付の処方に従って行った。前記のようにして調製したmRNA約1 μg を鋳型としてcDNA合成プライマーを加え、逆転写酵素と42℃、60分間反応させることによりcDNAへの逆転写を行った。

【0085】

これをDNAポリメラーゼI、DNAリガーゼ、RNase Hで16℃、1.5時間、T4 DNAポリメラーゼで16℃、45分間反応させることにより、2本鎖cDNAを合成した。2本鎖cDNAをフェノール及びクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿により回収した。T4 DNAリガーゼで16℃で一夜反応することにより、2本鎖cDNAの両端にcDNAアダプターを連結した。反応混合液は10 mM Tricine-KOH (pH 8.5)、0.1 mM EDTA溶液で50倍に希釈した。これを鋳型としてPCRによりL鎖V領域をコードする遺伝子を増幅させた。5'-側プライマーにはアダプタープライマー1を、3'-側プライマーにはMKCプライマー(配列番号2)(S.T. Jones, et al., Biotech

nology, 9, 88-89, 1991) を使用した。

【0086】

PCR溶液は、100 μ l 中に120 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM KCl、6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、0.2 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1 mM MgCl_2 、2.5 ユニットのKOD DNAポリメラーゼ(東洋紡績)、30~50 pmoleのアダプタープライマー1並びにMKCプライマー、及びcDNA アダプターを連結したcDNAの反応混合物1 μ lを含有する。

PCRはDNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer) を用い、94℃にて30秒間、55℃にて30秒間、74℃にて1分間の温度サイクルで30回行った。

【0087】

(3) PCR生成物の精製及び断片化

前記のPCR反応混合液をフェノール及びクロロホルムで抽出し、増幅したDNA断片をエタノール沈殿により回収した。DNA断片を制限酵素Xma I (New England Biolabs) により37℃で1時間消化した。Xma I消化混合物を2%から3%のNuSieve GTG アガロース(FMC BioProducts) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、H鎖V領域として約500 bp長、L鎖V領域として約500 bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA溶液(以下、TEと称す) 10 μ lに溶解した。

【0088】

上記のようにして調製したマウスH鎖V領域及びL鎖V領域をコードする遺伝子を含むXma I消化DNA断片と、Xma Iで消化することにより調製したpUC19プラスミドベクターとをDNAライゲーションキットver. 2 (宝酒造) を用い、添付の処方に従い16℃で1時間反応させ連結した。

この連結混合物を大腸菌JM109コンピテント細胞(ニッポンジーン) 100 μ lに加え、氷上で30分間、42℃にて1分間静置した。

【0089】

次いで $300\mu\text{l}$ の Hi-Competence Broth (ニッポンジーン) を加え 37°C にて 1 時間 インキュベートした後、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリンを含む LB 寒天培地 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) (以下、LBA 寒天培地と称す) 上にこの大腸菌をまき、 37°C にて一夜 インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。

この形質転換体を $50\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリンを含有する LB 培地 (以下、LBA 培地と称す) 3ml あるいは 4ml で 37°C にて一夜培養し、菌体画分から QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミド DNA を調製し、塩基配列の決定を行った。

【0090】

(4) マウス抗体 V 領域をコードする遺伝子の塩基配列決定

前記のプラスミド中の cDNA コード領域の塩基配列を Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer) を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer) により決定した。配列決定用プライマーとして M13 Primer M4 (宝酒造) (配列番号 3) 及び M13 Primer RV (宝酒造) (配列番号 4) を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。

【0091】

こうして得られたハイブリドーマ ATR-5 に由来するマウス H 鎖 V 領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドを ATR-5 Hv / pUC19 と命名し、そして L 鎖 V 領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドを ATR-5 Lv / pUC19 と命名した。プラスミド ATR-5 Hv / pUC19 に含まれる各マウス抗体の H 鎖 V 領域をコードする遺伝子の塩基配列 (対応するアミノ酸配列を含む) をそれぞれ配列番号 5 及び 99 に、プラスミド ATR-5 Lv / pUC19 に含まれる各マウス抗体の L 鎖 V 領域をコードする遺伝子の塩基配列 (対応するアミノ酸配列を含む) をそれぞれ配列番号 6 及び 100 に示す。

【0092】

参考例 4. キメラ抗体の構築

マウス ATR-5 抗体 V 領域をヒト抗体 C 領域に連結したキメラ ATR-5 抗

体を作製した。ATR-5抗体V領域をコードする遺伝子をヒト抗体C領域をコードする発現ベクターに連結することにより、キメラ抗体発現ベクターを構築した。

【0093】

(1) キメラ抗体H鎖V領域の構築

ヒト抗体H鎖C領域をコードする発現ベクターに連結するために、ATR-5抗体H鎖V領域をPCR法により修飾した。5'-側プライマーch5HS（配列番号7）はV領域をコードするDNAの5'-末端にハイブリダイズし、且つKozakコンセンサス配列（Kozak, M. et al., J. Mol. Biol., 196, 947-950, 1987）及び制限酵素SalIの認識配列を有するように設計した。3'-側プライマーch5HA（配列番号8）はJ領域をコードするDNAの3'-末端にハイブリダイズし、且つ制限酵素NheIの認識配列を有するように設計した。

【0094】

PCR溶液は、100 μ l中に120 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM KCl、6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、0.2 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1 mM MgCl_2 、2.5ユニットのKOD DNAポリメラーゼ（東洋紡績）、50 pmoleのch5HSプライマー並びにch5HAプライマー、及び鋳型DNAとして1 μ lのプラスミドATR5Hv/pUC19を含有する。PCRはDNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer)を用い、94℃にて30秒間、55℃にて30秒間、74℃にて1分間の温度サイクルで30回行った。

【0095】

PCR反応混合液をフェノール及びクロロホルムで抽出し、増幅したDNA断片をエタノール沈殿により回収した。DNA断片を制限酵素NheI（宝酒造）により37℃で1時間消化し、次いで制限酵素SalI（宝酒造）により37℃で1時間消化した。この消化混合物を3% NuSieve GTGアガロース（FMC BioProducts）を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約450 bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り出した。アガ

ロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、TE 20 μ l に溶解した。

【0096】

クローニングベクターには制限酵素Nhe I、Sal I及びSpl I、Bgl IIの認識配列を導入した改変pUC19ベクター（以下、CVIDECと称す）を用いた。上記のようにして調製したマウスH鎖V領域をコードする遺伝子断片とNhe I及びSal Iで消化することにより調製したCVIDECベクターをDNAライゲーションキットver. 2（宝酒造）を用い、添付の処方に従い16℃で1時間反応させ連結した。

【0097】

この連結混合物を大腸菌JM109コンピテント細胞（ニッポンジーン）100 μ lに加え、氷上で30分間、42℃にて1分間静置した。次いで300 μ lのHi-Competence Broth（ニッポンジーン）を加え37℃にて1時間インキュベートした後、100 μ g/ml LBA寒天培地上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体をLBA培地3mlで37℃にて一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit（QIAGEN）を用いてプラスミドDNAを調製した。

【0098】

プラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列をDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit（Perkin-Elmer）を用い、DNA Sequencer 373A（Perkin-Elmer）により決定した。配列決定用プライマーとしてM13 Primer M4（宝酒造）及びM13 Primer RV（宝酒造）を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。このATR-5抗体H鎖V領域をコードする遺伝子含有し、5'側Sal I認識配列及びKozakコンセンサス配列、3'側にNhe I認識配列を持つプラスミドをchATR5Hv/CVIDECと命名した。

【0099】

（2）キメラ抗体L鎖V領域の構築

ヒト抗体L鎖C領域をコードする発現ベクターに連結するために、ATR-5

抗体L鎖V領域をPCR法により修飾した。5' -側プライマーch5LS（配列番号9）はV領域をコードするDNAの5' -末端にハイブリダイズし、且つKozakコンセンサス配列（Kozak, M. et al., J. Mol. Biol., 196, 947-950, 1987）及び制限酵素BglIIの認識配列を有するように設計した。3' -側プライマーch5LA（配列番号10）はJ領域をコードするDNAの3' -末端にハイブリダイズし、且つ制限酵素SplIの認識配列を有するように設計した。

【0100】

PCR溶液は、100 μ l中に120mM Tris-HCl (pH8.0)、10mM KCl、6mM (NH₄)₂SO₄、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1mM MgCl₂、2.5ユニットのKOD DNAポリメラーゼ（東洋紡績）、50 pmoleのch5LSプライマー並びにch5LAプライマー、及び鋳型DNAとして1 μ lのプラスミドATR5Lv/pUC19を含有する。PCRはDNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer)を用い、94℃にて30秒間、55℃にて30秒間、74℃にて1分間の温度サイクルで30回行った。

【0101】

PCR反応混合液をフェノール及びクロロホルムで抽出し、増幅したDNA断片をエタノール沈殿により回収した。DNA断片を制限酵素SplI（宝酒造）により37℃で1時間消化し、次いで制限酵素BglII（宝酒造）により37℃で1時間消化した。この消化混合物を3% NuSieve GTGアガロース(FMC BioProducts)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約400bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、20 μ lのTEに溶解した。

【0102】

上記のようにして調製したマウスL鎖V領域をコードする遺伝子断片とSplI及びBglIIで消化することにより調製したCVIDECベクターをDNAライゲーションキットver. 2（宝酒造）を用い、添付の処方に従い16℃で1

時間反応させ連結した。

この連結混合物を大腸菌 JM109 コンピテント細胞 (ニッポンジーン) $100\mu\text{l}$ に加え、氷上で 30 分間、 42°C にて 1 分間静置した。次いで $300\mu\text{l}$ の Hi-Competence Broth (ニッポンジーン) を加え 37°C にて 1 時間インキュベートした後、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ LBA 寒天培地上にこの大腸菌をまき、 37°C にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体を LBA 培地 3ml で 37°C にて一夜培養し、菌体画分から QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミド DNA を調製した。

【0103】

プラスミド中の cDNA コード領域の塩基配列を Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer) を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer) により決定した。配列決定用プライマーとして M13 Primer M4 (宝酒造) 及び M13 Primer RV (宝酒造) を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。この ATR-5 抗体 L 鎖 V 領域をコードする遺伝子を含有し、5' 一侧に BglII 認識配列及び Kozak コンセンサス配列、3' 一侧に SspI 認識配列を持つプラスミドを chATR5Lv/CVIDEC と命名した。

【0104】

(3) キメラ抗体発現ベクターの構築

IDEC 社より導入した抗体発現ベクターを用いてキメラ抗体発現ベクターを構築した。ベクターには IgG1 型抗体発現ベクター N5KG1 (V) 及び IgG4 型抗体発現ベクター N5KG4P を用いた。発現ベクター N5KG1 (V) あるいは N5KG4P のヒト抗体 H 鎖 C 領域の直前にある SalI-NheI 部位に ATR-5 の H 鎖 V 領域をコードする遺伝子を、ヒト抗体 L 鎖 C 領域の直前にある BglII-SspI 部位に ATR-5 の L 鎖 V 領域をコードする遺伝子を連結することによって、キメラ ATR-5 抗体発現ベクターを作製した。

【0105】

(i) H 鎖 V 領域の導入

プラスミド chATR5Hv/CVIDEC を制限酵素 NheI (宝酒造) に

より 37℃ で 3 時間消化し、次いで制限酵素 *SaI* I (宝酒造) により 37℃ で 3 時間消化した。この消化混合物を 1.5% NuSieve GTG アガロース (FMC BioProducts) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約 450 bp 長の DNA 断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA 断片をエタノールで沈殿させた後、TE 20 μ l に溶解した。

【0106】

発現ベクター N5KG1 (V) 及び N5KG4P を制限酵素 *Nhe* I (宝酒造) により 37℃ で 3 時間消化し、次いで制限酵素 *SaI* I (宝酒造) により 37℃ で 3 時間消化した。この消化混合物を 1.5% NuSieve GTG アガロース (FMC BioProducts) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約 9000 bp 長の DNA 断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA 断片をエタノールで沈殿させた後、TE 60 μ l に溶解した。

上記のようにして調製した H鎖 V 領域をコードする遺伝子を含む *SaI* I - *Nhe* I DNA 断片と *SaI* I 及び *Nhe* I で消化した N5KG1 (V) あるいは N5KG4P を DNA ライゲーションキット ver. 2 (宝酒造) を用い、添付の処方に従い 16℃ で 1 時間反応させ連結した。

【0107】

この連結混合物を大腸菌 JM109 コンピテント細胞 (ニッポンジーン) 100 μ l に加え、氷上で 30 分間、42℃ にて 1 分間静置した。次いで 300 μ l の Hi-Competence Broth (ニッポンジーン) を加え 37℃ にて 1 時間インキュベートした後、100 μ g/ml LBA 寒天培地上にこの大腸菌をまき、37℃ にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体を LBA 培地 3 ml で 37℃ にて一夜培養し、菌体画分から QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミド DNA を調製した。これらキメラ ATR-5 抗体 H鎖をコードする遺伝子を含むプラスミドをそれぞれ *chATR5Hv*/N5KG1 (V)、及び *chATR5Hv*/N5KG4P と命名した。

【0108】

(ii) L鎖V領域の導入

プラスミド *chATR5Lv/CVIDEC* を制限酵素 *BglII* (宝酒造) 及び *SplI* (宝酒造) により 37℃ で 1.5 時間消化した。この消化混合物を 1.5% *NuSieve GTG* アガロース (FMC BioProducts) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約 400 bp 長の DNA 断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA 断片をエタノールで沈殿させた後、20 μ l の TE に溶解した。

【0109】

プラスミド *chATR5Hv/N5KG1 (V)* 及び *chATR5Hv/N5KG4P* を制限酵素 *BglII* (宝酒造) 及び *SplI* (宝酒造) により 37℃ で 1.5 時間消化した。この消化混合物を 1.5% *NuSieve GTG* アガロース (FMC BioProducts) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約 9400 bp 長の DNA 断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA 断片をエタノールで沈殿させた後、TE 20 μ l に溶解した。

【0110】

上記のようにして調製した L鎖V領域をコードする遺伝子を含む *SplI-BglII* DNA 断片と *SplI* 及び *BglII* で消化した *chATR5Hv/N5KG1 (V)* あるいは *chATR5Hv/N5KG4P* を DNA ライゲーションキット *ver. 2* (宝酒造) を用い、添付の処方に従い 16℃ で 1 時間反応させ連結した。

【0111】

この連結混合物を大腸菌 JM109 コンピテント細胞 (ニッポンジーン) 100 μ l に加え、氷上で 30 分間、42℃ にて 1 分間静置した。次いで 300 μ l の *Hi-Competence Broth* (ニッポンジーン) を加え 37℃ にて 1 時間インキュベートした後、100 μ g/ml LBA 寒天培地上にこの大腸菌をまき、37℃ にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体を 50 μ g/ml アンピシリンを含有する 2×YT 培地 1 l で 37℃ にて一夜培養し、菌体画分から *Plasmid Maxi Kit* (QIAGEN) を用いてプラス

ミドDNAを調製した。これらキメラATR-5抗体をコードする遺伝子を含むプラスミドをそれぞれchATR5/N5KG1(V)、chATR5/N5KG4Pと命名した。

【0112】

(4) COS-7細胞へのトランスフェクション

キメラ抗体の抗原結合活性及び中和活性を評価するため、前記発現プラスミドをCOS-7細胞にトランスフェクションし、キメラ抗体を一過性に発現させた。

プラスミドchATR5/N5KG1(V)あるいはchATR5/N5KG4PをGene Pulser装置(Bio Rad)を用いてエレクトロポレーションによりCOS-7細胞に形質導入した。ダルベッコPBS(-)(以下、PBSと称す)中に 1×10^7 細胞/mlの細胞濃度で懸濁されているCOS-7細胞0.78mlに、プラスミド50 μ gを加え、1,500V, 25 μ Fの静電容量にてパルスを与えた。

【0113】

室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を5%のUltra Low IgGウシ胎児血清(GIBCO)を含むDMEM培地(GIBCO)に懸濁し、10cm培養皿を用いてCO₂インキュベーターにて培養した。24時間の培養の後、培養上清を吸引除去し、新たに無血清培地HBCHO(アーバインサイエンティフィック)を加えた。さらに72時間の培養の後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去した。

【0114】

(5) 抗体の精製

COS-7細胞の培養上清からキメラ抗体を、rProtein A Sepharose Fast Flow(Pharmacia Biotech)を用いて以下のように精製した。

1mlのrProtein A Sepharose Fast Flowをカラムに充填し、10倍量のTBSを流すことによってカラムを平衡化した。平衡化したカラムにCOS-7細胞の培養上清をアプライした後、10倍量のTBSによってカラムを洗浄した。

【0115】

次に、13.5 mlの2.5 mM HCl (pH 3.0) を流すことによって吸着した抗体画分をカラムより溶出し、直ちに1.5 mlの1M Tris-HCl (pH 8.0) を加えることによって溶出液を中和した。

精製された抗体画分について、セントリプレップ100 (Amicon) を用いた限外濾過を2回行うことにより、150 mM NaClを含む50 mM Tris-HCl (pH 7.6) (以下、TBSと称す) に溶媒を置換し、最終的に約1.5 mlまで濃縮した。

【0116】

(6) CHO安定産生細胞株の樹立

キメラ抗体の安定産生細胞株を樹立するため、CHO-S-SFMII無血清培地(GIBCO) に馴化したCHO細胞(DG44) に前記発現プラスミドを導入した。

プラスミドchATR5/N5KG1 (V)あるいはchATR5/N5KG4Pを制限酵素SspI (宝酒造) で切断して直鎖状DNAにし、フェノール及びクロロホルムで抽出の後、エタノール沈殿でDNAを回収した。直鎖状にしたプラスミドをGene Pulser装置(Bio Rad) を用いてエレクトロポレーションによりDG44細胞に形質導入した。PBS中に 1×10^7 細胞/mlの細胞濃度で懸濁されているDG44細胞0.78 mlに、プラスミド10 μ gを加え、1,500 V, 25 μ Fの静電容量にてパルスを与えた。

【0117】

室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞をヒポキサンチン・チミジン(GIBCO) を含有するCHO-S-SFMII培地(GIBCO) に懸濁し、2枚の96穴プレート(Falcon) を用いてCO₂ インキュベーターにて培養した。培養開始翌日に、ヒポキサンチン・チミジン(GIBCO) 及び500 μ g/ml GENETICIN (G418Sulfate, GIBCO) を含有するCHO-S-SFMII培地(GIBCO) の選択培地に交換し、抗体遺伝子の導入された細胞を選択した。選択培地交換後、2週間前後に顕微鏡下で細胞を観察し、順調な細胞増殖が認められた後に、後述の抗体濃度測定ELISAにて抗体産生量を測定し、抗体産生量の多い細胞を選別した。

【0118】

参考例5. ヒト型化抗体の構築

(1) ヒト型化抗体H鎖の構築

(i) ヒト型化H鎖バージョン“a”の構築

ヒト型化ATR-5抗体H鎖を、PCR法によるCDR-グラフティングにより作製した。ヒト抗体L39130 (DDBJ, Gao L.ら、未発表、1995) 由来のFRを有するヒト型化ATR-5抗体H鎖バージョン“a”の作製のために7個のPCRプライマーを使用した。CDR-グラフティングプライマーhR5Hv1S (配列番号11)、hR5Hv2S (配列番号12) 及びhR5Hv4S (配列番号13) はセンスDNA配列を有し、そしてCDRグラフティングプライマーhR5Hv3A (配列番号14) 及びhR5Hv5A (配列番号15) はアンチセンスDNA配列を有し、そしてそれぞれプライマーの両端に18-35bpの相補的配列を有する。

【0119】

hR5Hv1SはKozakコンセンサス配列 (Kozak, M, ら、J. Mol. Biol. 196, 947-950, 1987) 及びSalI認識部位を有するように、またhR5Hv5AはNheI認識部位を有するように設計した。また外部プライマーhR5HvPrS (配列番号16) はCDRグラフティングプライマーhR5Hv1Sと、hR5HvPrA (配列番号17) はCDRグラフティングプライマーhR5Hv5Aとホモロジーを有する。

CDR-グラフティングプライマーhR5Hv1S、hR5Hv2S、hR5Hv3A、hR5Hv4S及びhR5Hv5A、ならびに外部プライマーhR5HvPrS及びhR5HvPrAはPharmacia Biotechにより合成及び精製された。

【0120】

PCRは、KOD DNAポリメラーゼ (東洋紡績) を用い、98 μ l中に120mM Tris-HCl (pH8.0)、10mM KCl、6mM (NH₄)₂SO₄、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1m

MgCl₂、2.5ユニットのKOD DNAポリメラーゼ（東洋紡績）、CDR-グラフティングプライマーhR5Hv1S、hR5Hv2S、hR5Hv3A、hR5Hv4S及びhR5Hv5Aをそれぞれ5 pmoleを含む条件で添付緩衝液を使用して94℃にて30秒間、50℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで5回行い、さらに100 pmoleの外部プライマーhR5HvPrS及びhR5HvPrAを加え、100 µlの系で同じ温度サイクルを25回行った。PCR法により増幅したDNA断片を2%のNuSieve GTGアガロース（FMC Bio.Products）を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

【0121】

約430 bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切取り、3倍量（ml/g）のTEを添加し、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出によりDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノールで沈殿させた後、その3分の1量を水17 µlに溶解した。得られたPCR反応混合物をNheI及びSalIで消化し、NheI及びSalIで消化することにより調製したプラスミドベクターCVIDECに、DNAライゲーションキットver. 2（宝酒造）を用い添付の処方に従って反応させ連結した。

【0122】

この連結混合物を大腸菌JM109コンピテント細胞（ニッポンジーン）100 µlに加え、氷上で30分間、42℃にて1分間静置した。次いで300 µlのHi-Competence Broth（ニッポンジーン）を加え37℃にて1時間インキュベートした後、100 µg/ml LBA寒天培地上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体をLBA培地3 mlで37℃にて一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit（QIAGEN）を用いてプラスミドDNAを調製した。

【0123】

プラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列をDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit（Perkin-Elmer）を用い、DNA Sequencer 373A（Perkin-Elmer）により決定した。配列決定用プライマーとしてM13 Primer M4（宝酒造）及びM13 Primer RV（宝酒造）を用い、両方向の塩基配列を確認することによ

り配列を決定した。

【0124】

EcoT22I 認識部位の前もしくは後に変異、欠失が認められたため、それぞれ正しい配列を有する断片を連結して再度 CVIDE C にサブクローニングし、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドを hATR5Hv a / CVIDEC と命名した。プラスミド hATR5Hv a / CVIDEC に含まれるヒト型化 H 鎖バージョン “a” の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号 18 に示す。また、バージョン “a” のアミノ酸配列を配列番号 19 に示す。

【0125】

(i i) ヒト型化 H 鎖バージョン “b” 及び “c” の構築

バージョン “b” 及び “c” を FR-シャッフリング法によってバージョン “a” の FR3 を別のヒト抗体由来の FR3 に置換し作製した。バージョン “b” では FR3 をヒト抗体 Z34963 (DDBJ, Borretzen M. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 91, 12917-12921, 1994) 由来のものに置換するため、FR3 をコードする DNA プライマーを 4 個作製した。FR-シャッフリングプライマー F3RFFS (配列番号 20) 及び F3RFB S (配列番号 21) はセンス DNA 配列を有し、F3RFFA (配列番号 22) 及び F3RFB A (配列番号 23) はアンチセンス DNA 配列を有する。

【0126】

F3RFFS と F3RFFA は互いに相補的な配列を有し、両端に B a l I 及び X h o I の認識配列を有する。バージョン “c” では FR3 をヒト抗体 P 0 1 8 2 5 (SWISS-PROT, Poljak R J. ら, Biochemistry, 16, 3412-3420, 1977) 由来のものに置換するため、FR3 をコードする DNA プライマーを 4 個作製した。FR-シャッフリングベクター F3NMFS (配列番号 24) 及び F3NMBS (配列番号 25) はセンス DNA 配列を有し、F3NMFA (配列番号 26) 及び F3NMBA (配列番号 27) はアンチセンス DNA 配列を有する。F3RFB S と F3RFB A は互いに相補的な配列を有し、両端に X h o I 及び N c o I の認識配列を有する。

【0127】

F3RFFS、F3RFBS、F3RFFA、F3RFBA、F3NMFS、F3NMBS、F3NMFA及びF3NMBAはPharmacia Biotechにより合成された。F3RFFSとF3RFFA、F3RFBSとF3RFBAをアニールさせ、それぞれBali及びXhoI、NcoI及びXhoIで消化した。これらをBali及びNcoIで消化することにより調製したプラスミドhATR5Hva/CVIDEC (Bali/NcoI)に導入し、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドをhATR5Hvb/CVIDECと命名した。プラスミドhATR5Hvb/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン“b”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号28に示す。また、バージョン“b”のアミノ酸配列を配列番号29に示す。

【0128】

F3NMFSとF3NMFA、F3NMBSとF3NMBAをアニールさせ、それぞれBali及びXhoI、NcoI及びXhoIで消化した。これらをBali及びNcoIで消化することにより調製したプラスミドhATR5Hva/CVIDEC (Bali/NcoI)に導入し、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドをhATR5Hvc/CVIDECと命名した。プラスミドhATR5Hvc/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン“c”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号30に示す。また、バージョン“c”のアミノ酸配列を配列番号31に示す。

【0129】

(iii) ヒト型化H鎖バージョン“d”及び“e”の構築

バージョン“d”及び“e”をFR-シャッフリング法によってバージョン“a”のFR3を別のヒト抗体由来のFR3に置換し作製した。バージョン“d”ではFR3をヒト抗体M62723 (DDBJ, Pascual V.ら, J.Clin.Invest., 86, 1320-1328, 1990)由来のものに置換するため、FR3をコードするDNAプライマーを4個作製した。FR-シャッフリングプライマーF3EPS (配列番号32) はセンスDNA配列を有し、F3EPA (配列番号33) はアンチセンスDNA配列を有し、プライマーの3'-末端は18bpの相補的配列を有する。

【0130】

また外部プライマー F3PrS (配列番号 34) 及び F3PrA (配列番号 35) は FR-シャッフリングプライマー F3EPS 及び F3EPA とホモロジーを有し、他の FR3 のシャッフリングにも用いることができる。バージョン “e” では FR3 をヒト抗体 Z80844 (DDBJ, Thomsett AR.ら, unpublished) 由来のものに置換するため、FR3 をコードする DNA プライマーを 2 個作製した。FR-シャッフリングプライマー F3VHS (配列番号 36) はセンス DNA 配列を有し、F3VHA (配列番号 37) はアンチセンス DNA 配列を有し、プライマーの 3'-末端は 18bp の相補的配列を有する。F3EPS、F3EPA、F3PrS、F3PrA、F3VHS 及び F3VHA は Pharmacia Biotech により合成された。

【0131】

PCR は、KOD DNA Polymerase (東洋紡績) を使い、100 μ l の反応混合液に 1 μ M の FR-シャッフリングプライマー F3EPS と F3EPA、又は F3VHS と F3VHA をそれぞれ 5 μ l、0.2 mM の dNTPs、1.0 mM の $MgCl_2$ 、2.5 U の KOD DNA ポリメラーゼを含む条件で添付緩衝液を使用して 94℃ にて 30 秒間、50℃ にて 1 分間、74℃ にて 1 分間の温度サイクルで 5 回行い、さらに 100 pmole の外部プライマー F3PrS 及び F3PrA を加え、同じ温度サイクルを 25 回行った。

【0132】

PCR 法により増幅した DNA 断片を 2% の Nu Sieve GTG アガロース (FMC Bio. Products) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。424 bp 長の DNA 断片を含有するアガロース片を切取り、3 倍量 (ml/g) の TE を添加し、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出により DNA 断片を精製した。精製した DNA をエタノールで沈殿させた後、その 3 分の 1 量を水 14 μ l に溶解した。得られた PCR 反応混合物を BalI 及び NcoI で消化し、これらを BalI 及び NcoI で消化することにより調製したプラスミド hATR5Hva/CVIDEC (BalI/NcoI) に導入し、塩基配列を決定した。

【0133】

正しい配列を有するプラスミドをhATR5Hvd/CVIDEC及びhATR5Hve/CVIDECと命名した。プラスミドhATR5Hvd/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン“d”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号38に、バージョン“d”のアミノ酸配列を配列番号39に示す。また、プラスミドhATR5Hve/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン“e”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号40に、バージョン“e”のアミノ酸配列を配列番号41に示す。

【0134】

(iv) ヒト型化H鎖バージョン“f”及び“g”の構築

バージョン“f”及び“g”はFR-シャッフリング法によってバージョン“a”のFR3を別のヒト抗体由来のFR3に置換し作製した。バージョン“f”はヒト抗体L04345 (DDBJ, Hillson JL. ら, J.Exp.Med., 178, 331-336, 1993) 由来のFR3に、バージョン“g”はS78322 (DDBJ, Bejcek BE. ら, Cancer Res., 55, 2346-2351, 1995) 由来のFR3に置換するためFR3をコードするプライマーを2個ずつ合成した。バージョン“f”のFR-シャッフリングプライマーF3SSS (配列番号42) はセンスDNA配列を有し、F3SSA (配列番号43) はアンチセンスDNA配列を有し、プライマーの3'-末端は18bpの相補的配列を有する。

【0135】

バージョン“g”のFR-シャッフリングプライマーF3CDS (配列番号44) はセンスDNA配列を有し、F3CDA (配列番号45) はアンチセンスDNA配列を有し、プライマーの3'-末端は18bpの相補的配列を有する。F3SSS、F3SSA、F3CDS及びF3CDAはPharmacia Biotechにより合成及び精製された。PCRは、KOD DNAポリメラーゼ (東洋紡績) を用い、100 μ lの反応混合液に1 μ MのFR-シャッフリングプライマーF3SSS及びF3SSAもしくはF3CDS及びF3CDAをそれぞれ5 μ lずつ、0.2mMのdNTPs、1.0mMのMgCl₂、2.5UのKOD DNAポリメラーゼを含む条件で添付緩衝液を使用して94℃にて30秒間、50℃にて1分間、74℃にて1分間の温度サイクルで5回行い、さらに100pmol

e の外部プライマー F3PrS 及び F3PrA を加え、同じ温度サイクルを 25 回行った。

【0136】

PCR 法により増幅した DNA 断片を 2% の Nu Sieve GTG アガロース (FMC Bio. Products) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。424 bp 長の DNA 断片を含有するアガロース片を切り取り、3 倍量 (ml/g) の TE を添加し、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出により DNA 断片を精製した。精製した DNA をエタノールで沈殿させた後、その 3 分の 1 量を水 14 μ l に溶解した。得られた PCR 反応混合物を BalI 及び NcoI で消化し、これらを BalI 及び NcoI で消化することにより調製したプラスミド hATR5Hv a/CVIDEC (BalI/NcoI) に導入し、塩基配列を決定した。

【0137】

正しい配列を有するプラスミドを hATR5Hv f/CVIDEC 及び hATR5Hv g/CVIDEC と命名した。プラスミド hATR5Hv f/CVIDEC に含まれるヒト型化 H 鎖バージョン “f” の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン “f” アミノ酸配列を配列番号 46 及び 47 に示す。また、プラスミド hATR5Hv g/CVIDEC に含まれるヒト型化 H 鎖バージョン “g” の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン “g” のアミノ酸配列を配列番号 48 及び 49 に示す。

【0138】

(v) ヒト型化 H 鎖バージョン “h” の構築

バージョン “h” は FR-シャッフリング法によってバージョン “a” の FR3 を別のヒト抗体由来の FR3 に置換し作製した。バージョン “h” はヒト抗体 Z26827 (DDBJ, Van Der Stoep ら, J.Exp.Med., 177, 99-107, 1993) 由来の FR3 に置換するため FR3 をコードするプライマーを 2 個ずつ合成した。バージョン “h” の FR-シャッフリングプライマー F3ADS (配列番号 50) はセンス DNA 配列を有し、F3ADA (配列番号 51) はアンチセンス DNA 配列を有し、プライマーの 3' -末端は 18 bp の相補的配列を有する。

【0139】

F3ADS及びF3ADAは Pharmacia Biotechにより合成及び精製された。PCRは、KOD DNAポリメラーゼ（東洋紡績）を用い、100 μ lの反応混合液に1 μ MのFR-シャッフリングプライマーF3ADS及びF3ADAをそれぞれ5 μ lずつ、0.2 mMのdNTPs、1.0 mMのMgCl₂、2.5 UのKOD DNAポリメラーゼを含む条件で添付緩衝液を使用して94℃にて30秒間、50℃にて1分間、74℃にて1分間の温度サイクルで5回行い、さらに100 pmoleの外部プライマーF3PrS及びF3PrAを加え、同じ温度サイクルを25回行った。PCR法により増幅したDNA断片を2%のNuSieve GTGアガロース（FMC Bio. Products）を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

【0140】

424 bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切取り、3倍量（ml/g）のTEを添加し、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出によりDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノールで沈殿させた後、その3分の1量を水14 μ lに溶解した。得られたPCR反応混合物をBamHI及びNcoIで消化し、これらをBamHI及びNcoIで消化することにより調製したプラスミドhATR5Hva/CVIDEC（BamHI/NcoI）に導入し、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドをhATR5Hvh/CVIDECと命名した。プラスミドhATR5Hvh/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン“h”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号52に示す。また、バージョン“h”のアミノ酸配列を配列番号53に示す。

【0141】

（vi）ヒト型化H鎖バージョン“i”及び“j”の構築

バージョン“i”及び“j”はFR-シャッフリング法によってバージョン“a”のFR3を別のヒト抗体由来のFR3に置換し作製した。バージョン“i”はヒト抗体U95239（DDBJ, Manheimer-Lory AJ., unpublished）由来のFR3に、バージョン“j”はL03147（DDBJ, Collet TA.ら, Proc.Natl.Acad

.Sci. U.S.A., 89, 10026-10030, 1992)由来のFR3に置換するためFR3をコードするプライマーを2個ずつ合成した。バージョン“i”のFR-シャッフリングプライマーF3MMS(配列番号54)はセンスDNA配列を有し、F3MMA(配列番号55)はアンチセンスDNA配列を有し、プライマーの3'-末端は18bpの相補的配列を有する。

【0142】

バージョン“j”のFR-シャッフリングプライマーF3BMS(配列番号56)はセンスDNA配列を有し、F3BMA(配列番号57)はアンチセンスDNA配列を有し、プライマーの3'-末端は18bpの相補的配列を有する。F3MMS、F3MMA、F3BMS及びF3BMAはPharmacia Biotechにより合成及び精製された。PCRは、Ampli Taq Gold (Perkin-Elmer)を用い、100 μ lの反応混合液に1 μ MのFR-シャッフリングプライマーF3MMSとF3MMA、又はF3BMSとF3BMAをそれぞれ5 μ lずつ、0.2mMのdNTPs、1.5mMのMgCl₂、2.5UのAmpli Taq Goldを含む条件で添付緩衝液を使用して94℃にて30秒間、50℃にて1分間、74℃にて1分間の温度サイクルで5回行い、さらに100 pmoleの外部プライマーF3PrS及びF3PrAを加え、同じ温度サイクルを25回行った。

【0143】

PCR法により増幅したDNA断片を2%のNuSieve GTGアガロース(FMC Bio. Products)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。424bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切取り、3倍量(ml/g)のTEを添加し、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出によりDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノールで沈殿させた後、その3分の1量を水14 μ lに溶解した。得られたPCR反応混合物をBamHI及びNcoIで消化し、これらをBamHI及びNcoIで消化することにより調製したプラスミドhATR5Hva/CVIDEC(BamHI/NcoI)に導入し、塩基配列を決定した。

【0144】

正しい配列を有するプラスミドをhATR5Hvi/CVIDEC及びhAT

R5Hvj/CVIDECと命名した。プラスミドhATR5Hvi/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン“i”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン“i”アミノ酸配列を配列番号58及び59に示す。また、プラスミドhATR5Hvj/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン“j”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン“j”のアミノ酸配列を配列番号60及び61に示す。

【0145】

(vii) ヒト型化H鎖バージョン“b1”及び“d1”の構築

バージョン“b1”及び“d1”はFR-シャッフリング法によってバージョン“b”及び“d”のFR2を別のヒト抗体由来のFR2に置換し作製した。ヒト抗体P01742 (SWISS-PROT, Cunningham BA.ら, Biochemistry, 9, 3161-3170, 1970) 由来のものに置換するため、FR2をコードするDNAプライマーを2個作製した。FR-シャッフリングベクターF2MPS (配列番号62) はセンスDNA配列を有し、F2MPA (配列番号63) はアンチセンスDNA配列を有する。また、互いに相補的な配列を有し、両端にはEcoT22I及びBaliIの認識配列を有する。

【0146】

F2MPS、F2MPAは Pharmacia Biotechにより合成及び精製された。F2MPSとF2MPAをアニールさせ、EcoT22I及びBaliIで消化した。これをEcoT22I及びBaliIで消化することにより調製したプラスミドhATR5Hvb/CVIDEC (EcoT22I/BaliI) 及びhATR5Hvd/CVIDEC (EcoT22I/BaliI) に導入し、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドをhATR5Hvb1/CVIDEC及びhATR5Hvd1/CVIDECと命名した。プラスミドhATR5Hvb1/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン“b1”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン“b1”アミノ酸配列を配列番号64及び65に示す。また、プラスミドhATR5Hvd1/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン“d1”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン“d1”のアミノ酸配列を配列番号66及び67に示す。

【0147】

(v i i i) ヒト型化H鎖バージョン“b3”及び“d3”の構築

バージョン“b3”及び“d3”はFR-シャッフリング法によってバージョン“b”及び“d”のFR2を別のヒト抗体由来のFR2に置換し作製した。ヒト抗体Z80844 (DDBJ, Thomsett AR.ら, unpublished)由来のFR2に置換するため、FR2をコードするDNAプライマーを2個作製した。FR-シャッフリングベクターF2VHS (配列番号68) はセンスDNA配列を有し、F2VHA (配列番号69) はアンチセンスDNA配列を有する。また、互いに相補的な配列を有し、両端にはEcoT22I及びBaliの認識配列を有する。F2VHS、F2VHAは Pharmacia Biotechに合成、精製を委託した。

【0148】

F2VHSとF2VHAをアニールさせ、EcoT22I及びBaliで消化した。これをEcoT22I及びBaliで消化することにより調製したプラスミドhATR5Hvb/CVIDEC (EcoT22I/Bali) 及びhATR5Hvd/CVIDEC (EcoT22I/Bali) に導入し、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドをhATR5Hvb3/CVIDEC 及びhATR5Hvd3/CVIDECと命名した。プラスミドhATR5Hvb3/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン“b3”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン“b3”アミノ酸配列を配列番号70及び71に示す。また、プラスミドhATR5Hvd3/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン“d3”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン“d3”のアミノ酸配列を配列番号72及び73に示す。

【0149】

(2) ヒト型化抗体L鎖V領域の構築

(i) バージョン“a”

ヒト型化ATR5抗体L鎖を、PCR法によるCDR-グラフティングにより作製した。ヒト抗体Z37332 (DDBJ, Welschof Mら, J.Immunol.Methods, 179, 203-214, 1995)由来のフレームワーク領域を有するヒト型化抗体L鎖 (バージョン“a”) の作製のために7本のPCRプライマーを使用した。

【0150】

CDR-グラフティングプライマー-h5Lv1S (配列番号74) 及びh5Lv4S (配列番号75) はセンスDNA配列を、CDRグラフティングプライマー-h5Lv2A (配列番号76)、h5Lv3A (配列番号77) 及びh5Lv5A (配列番号78) はアンチセンスDNA配列を有し、各プライマーの両端に20bpの相補的配列を有する。外部プライマー-h5LvS (配列番号79) 及びh5LvA (配列番号80) はCDRグラフティングプライマー-h5Lv1S 及びh5Lv5Aとホモロジーを有する。CDR-グラフティングプライマー-h5Lv1S、h5Lv4S、h5Lv2A、h5Lv3A、h5Lv5A、h5LvS及びh5LvAは Pharmacia Biotechに合成、精製を委託した。

【0151】

PCR溶液は、100 μ l中に120mM Tris-HCl (pH8.0)、10mM KCl、6mM (NH₄)₂SO₄、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1mM MgCl₂、2.5ユニットのKOD DNAポリメラーゼ (東洋紡績)、5pmoleのCDRグラフティングプライマー-h5Lv1S、h5Lv2A、h5Lv3A、h5Lv4S、及びh5Lv5Aを含有する。

【0152】

PCRはDNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer) を用い、94℃にて30秒間、50℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルを5回行うことにより、5本のCDRグラフティングプライマーをアセンブルした。この反応混合液に100pmoleの外部プライマー-h5LvS及びh5LvAを加え、94℃にて30秒間、52℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルを30回行うことにより、アセンブルしたDNA断片を増幅した。

【0153】

PCR反応混合液を3% NuSieve GTGアガロース (FMC BioProducts) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約400bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出

し、DNA断片をエタノール沈殿により回収した。回収したDNA断片を制限酵素S p l I（宝酒造）及びB g l II（宝酒造）により37℃で4時間消化した。この消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、TE10 μ lに溶解した。上記のようにして調製したヒト型化抗体L鎖V領域をコードする遺伝子を含むS p l I-B g l II DNA断片とS p l I及びB g l IIで消化することにより調製したCVIDECベクターをDNAライゲーションキットver. 2（宝酒造）を用い、添付の処方に従い16℃で1時間反応させ連結した。

【0154】

この連結混合物を大腸菌JM109コンピテント細胞（ニッポンジーン）100 μ lに加え、氷上で30分間、42℃にて1分間静置した。次いで300 μ lのHi-Competence Broth（ニッポンジーン）を加え37℃にて1時間インキュベートした後、100 μ g/ml LBA寒天培地上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体をLBA培地3 mlで37℃にて一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit（QIAGEN）を用いてプラスミドDNAを調製した。

【0155】

プラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列をDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit（Perkin-Elmer）を用い、DNA Sequencer 373A（Perkin-Elmer）により決定した。配列決定用プライマーとしてM13 Primer M4（宝酒造）及びM13 Primer RV（宝酒造）を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。このヒト型化抗体L鎖V領域をコードする遺伝子を含む、5'側にはB g l II認識配列及びK o z a k配列、3'側にはS p l I認識配列を持つプラスミドをh A T R 5 L v a / C V I D E Cと命名した。ヒト型化L鎖バージョン“a”の塩基配列（対応するアミノ酸を含む）を配列番号81に示す。また、バージョン“a”のアミノ酸配列を配列番号82に示す。

【0156】

(i i) バージョン“b”及び“c”

バージョン“b”及び“c”を、バージョン“a”のFR3を置換（FR-シヤッフリング）することにより作製した。バージョン“b”にはヒト抗体S68699（DDBJ、Hougs L ら、Exp.Clin.Immunogen et., 10, 141-151, 1993）由来のFR3を、バージョン“c”にはヒト抗体P01607（SWISS-PROT、Epp O ら、Biochemistry, 14, 4943-4952, 1975）由来のFR3をそれぞれ使用した。

【0157】

バージョン“b”のFR3をコードするプライマーF3SS（配列番号83）とF3SA（配列番号84）、あるいはバージョン“c”のFR3をコードするプライマーF3RS（配列番号85）とF3RA（配列番号86）は互いに相補的な配列を有し、両端に制限酵素KpnI及びPstIの認識配列を有する。F3SS、F3SA、F3RS、F3RAは Pharmacia Biotechに合成、精製を委託した。各100 pmoleのF3SSとF3SA、あるいはF3RSとF3RAを96℃にて2分間、50℃にて2分間処理することによりアニーリングさせ、2本鎖DNA断片を作製した。

【0158】

これら2本鎖DNA断片を制限酵素KpnI（宝酒造）により37℃で1時間消化し、次いで制限酵素PstI（宝酒造）により37℃で1時間消化した。消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、TEに溶解した。

プラスミドhATR5Lva/CVIDECを制限酵素KpnI（宝酒造）により37℃で1時間消化し、次いで制限酵素PstI（宝酒造）により37℃で1時間消化した。消化混合物を1.5% NuSieve GTGアガロース（FMC BioProducts）を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約3000bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、TEに溶解した。

【0159】

上記のようにして調製したバージョン“b”あるいは“c”のFR3をコードするKpnI-PstI DNA断片とKpnI及びPstIで消化することによりFR3を除去したhATR5Lva/CVIDECベクターをDNAライゲ

ーションキット ver. 2 (宝酒造) を用い、添付の処方に従い 16℃ で 1 時間反応させ連結した。

【0160】

この連結混合物を大腸菌 JM109 コンピテント細胞 (ニッポンジーン) 100 μ l に加え、氷上で 30 分間、42℃ にて 1 分間静置した。次いで 300 μ l の Hi-Competence Broth (ニッポンジーン) を加え 37℃ にて 1 時間インキュベートした後、100 μ g/ml LBA 寒天培地上にこの大腸菌をまき、37℃ にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体を LBA 培地 3 ml で 37℃ にて一夜培養し、菌体画分から QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミド DNA を調製した。

【0161】

プラスミド中の cDNA コード領域の塩基配列を Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer) を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer) により決定した。配列決定用プライマーとして M13 Primer M4 (宝酒造) 及び M13 Primer RV (宝酒造) を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。

【0162】

これらヒト型化抗体 L 鎖バージョン “a” の FR3 を置換したバージョン “b” あるいはバージョン “c” をコードする遺伝子を含むプラスミドをそれぞれ hATR5Lv b/CVIDEC、hATR5Lv c/CVIDEC と命名した。プラスミド hATR5Lv b/CVIDEC に含まれるヒト型化 L 鎖バージョン “b” の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン “b” アミノ酸配列を配列番号 87 および 88 に示す。また、プラスミド hATR5Lv c/CVIDEC に含まれるヒト型化 L 鎖バージョン “c” の塩基配列及び対応するアミノ酸配列およびバージョン “c” のアミノ酸配列を配列番号 89 および 90 に示す。

【0163】

(iii) バージョン “b1” 及び “b2”

バージョン “b1” 及び “b2” を、バージョン “b” の FR2 を置換するこ

とにより作製した。バージョン“b1”にはヒト抗体S65921 (DDBJ、Tonge DWら, Year Immunol., 7, 56-62, 1993)由来のFR2を、バージョン“b2”にはヒト抗体X93625 (DDBJ、Cox JPら, Eur.J.Immunol., 24, 827-836, 1994)由来のFR2をそれぞれ使用した。

【0164】

バージョン“b1”のFR2をコードするプライマーF2SS (配列番号91) とF2SA (配列番号92)、あるいはバージョン“b2”のFR2をコードするプライマーF2XS (配列番号93) とF2XA (配列番号94) は互いに相補的な配列を有し、両端に制限酵素AflII及びSpeIの認識配列を有する。F2SS、F2SA、F2XS及びF2XAは Pharmacia Biotechにより合成された。各100 pmoleのF2SSとF2SA、あるいはF2XSとF2XAを96℃にて2分間、50℃にて2分間処理することによりアニーリングさせ、2本鎖DNA断片を作製した。

【0165】

これら2本鎖DNA断片を制限酵素AflII (宝酒造) 及びSpeI (宝酒造) により37℃で1時間消化した。消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、TEに溶解した。

プラスミドhATR5Lv b/CVIDECを制限酵素AflII (宝酒造) 及びSpeI (宝酒造) により37℃で1時間消化した。消化混合物を1.5% NuSieve GTGアガロース (FMC BioProducts) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約3000 bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、TEに溶解した。

【0166】

上記のようにして調製したバージョン“b1”あるいは“b2”のFR2をコードするAflII-SpeI DNA断片とAflII及びSpeIで消化することによりFR2を除去したhATR5Lv b/CVIDECベクターをDNAライゲーションキットver. 2 (宝酒造) を用い、添付の処方に従い16℃で1時間反応させ連結した。

【0167】

この連結混合物を大腸菌 JM109 コンピテント細胞（ニッポンジーン）100 μ l に加え、氷上で30分間、42℃にて1分間静置した。次いで300 μ l のHi-Competence Broth（ニッポンジーン）を加え37℃にて1時間インキュベートした後、100 μ g/ml LBA寒天培地上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体をLBA培地4mlで37℃にて一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit（QIAGEN）を用いてプラスミドDNAを調製した。

【0168】

プラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列をDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit（Perkin-Elmer）を用い、DNA Sequencer 373A（Perkin-Elmer）により決定した。配列決定用プライマーとしてM13 Primer M4（宝酒造）及びM13 Primer RV（宝酒造）を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。

【0169】

これらヒト型化抗体L鎖バージョン“b”のFR2を置換したバージョン“b1”あるいはバージョン“b2”をコードする遺伝子を含むプラスミドをそれぞれhATR5Lv b1/CVIDEC及びhATR5Lv b2/CVIDECと命名した。プラスミドhATR5Lv b1/CVIDECに含まれるヒト型化L鎖バージョン“b1”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列及びバージョン“b1”アミノ酸配列を配列番号95及び96に示す。また、プラスミドhATR5Lv b2/CVIDECに含まれるヒト型化L鎖バージョン“b2”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列及びバージョン“b2”のアミノ酸配列を配列番号97及び98に示す。

【0170】

(3) ヒト型化抗体の発現ベクターの構築

(i) ヒト型化H鎖とキメラL鎖との組合せ

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hv a/CVIDECをNhe I及びSal Iで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、chATR-

5抗体発現プラスミドベクター、chATR5/N5KG4PをNheI及びSalIにて消化することにより調製したchATR5/N5KG4P (SalI/NheI) に導入した。こうして作製したプラスミドをhHva-chLv/N5KG4Pと命名した。

【0171】

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hvb/CVIDECをNheI及びSalIで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、chATR-5抗体発現プラスミドベクター、chATR5/N5KG4PをNheI及びSalIにて消化することにより調製したchATR5/N5KG4P (SalI/NheI) に導入した。こうして作製したプラスミドをhHvb-chLv/N5KG4Pと命名した。

【0172】

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hvc/CVIDEC、hATR5Hvd/CVIDEC及びhATR5Hve/CVIDECをNheI及びSalIで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、chATR-5抗体発現プラスミドベクター、chATR5/N5KG4PをNheI及びSalIにて消化することにより調製したchATR5/N5KG4P (SalI/NheI) に導入した。こうして作製したプラスミドをhHvc-chLv/N5KG4P、hHvd-chLv/N5KG4P及びhHve-chLv/N5KG4Pと命名した。

【0173】

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hvf/CVIDEC及びhATR5Hvh/CVIDECをNheI及びSalIで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、chATR-5抗体発現プラスミドベクター、chATR5/N5KG4PをNheI及びSalIにて消化することにより調製したchATR5/N5KG4P (SalI/NheI) に導入した。こうして作製したプラスミドをhHvf-chLv/N5KG4P及びhHvh-chLv/N5KG4Pと命名した。

【0174】

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hvi/CVIDEC及びhATR5Hvj/CVIDECをNheI及びSalIで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、chATR-5抗体発現プラスミドベクター、chATR5/N5KG4PをNheI及びSalIにて消化することにより調製したchATR5/N5KG4P(SalI/NheI)に導入した。こうして作製したプラスミドをhHvi-chLv/N5KG4P及びhHvj-chLv/N5KG4Pと命名した。

【0175】

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hvb1/CVIDEC及びhATR5Hvd1/CVIDECをNheI及びSalIで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、chATR-5抗体発現プラスミドベクター、chATR5/N5KG4PをNheI及びSalIにて消化することにより調製したchATR5/N5KG4P(SalI/NheI)に導入した。こうして作製したプラスミドをhHvb1-chLv/N5KG4P及びhHvd1-chLv/N5KG4Pと命名した。

【0176】

(ii) ヒト型化L鎖とキメラH鎖との組み合わせ

抗体発現ベクターN5KG4Pを用いて、キメラH鎖との組み合わせでヒト型化抗体を発現させることにより、ヒト型化L鎖の評価を行った。

プラスミドhATR5Lva/CVIDEC、hATR5Lvb/CVIDEC、hATR5Lvc/CVIDEC、hATR5Lvb1/CVIDEC、hATR5Lvb2/CVIDECを制限酵素BglII(宝酒造)及びSplI(宝酒造)により37℃で2~3時間消化した。消化混合物を1.5%または2%

NuSieve GTGアガロース(FMC BioProducts)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約400bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、TEに溶解した。

【0177】

これら各バージョンのヒト型化L鎖V領域をコードする遺伝子を含むSplI

-Bgl II DNA断片とSpl I及びBgl IIで消化したchATR5Hv/N5KG4PをDNAライゲーションキットver. 2 (宝酒造) を用い、添付の処方に従い16℃で1時間反応させ連結した。

【0178】

連結混合物を大腸菌JM109コンピテント細胞(ニッポンジーン) 100 μ lに加え、氷上で30分間、42℃にて1分間静置した。次いで300 μ lのHi-Competence Broth(ニッポンジーン) を加え37℃にて1時間インキュベートした後、100 μ g/ml LBA寒天培地上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。

【0179】

この形質転換体をLBA培地250mlまたは500mlで37℃にて一夜培養し、菌体画分からPlasmid Maxi Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドDNAを調製した。これらキメラH鎖とヒト型化L鎖をコードする遺伝子を導入したプラスミドをそれぞれchHv-hLv a/N5KG4P、chHv-hLv b/N5KG4P、chHv-hLv c/N5KG4P、chHv-hLv b1/N5KG4P及びchHv-hLv b2/N5KG4Pと命名した。

【0180】

(iii) ヒト型化H鎖とヒト型化L鎖の組合せ

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hv a/CVIDECをNhe I及びSal Iで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、ヒト型化ATR-5抗体L鎖バージョン“a” cDNAの配列を含むプラスミドchHv-hLv a/N5KG4PをNhe I及びSal Iにて消化することにより調製したhLv a/N5KG4P (Sal I/Nhe I) に導入した。こうして作製したプラスミドをhHv a-hLv a/N5KG4Pと命名した。

【0181】

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hv b/CVIDEC及びhATR5Hv c/CVIDECをNhe I及びSal Iで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、ヒト型化ATR-5抗体L鎖バージョン“a” cDNAの配列を含むプラスミドchHv-hLv a/N5KG4PをNhe I及びSa

1 Iにて消化することにより調製したhLv a/N5KG4P (Sal I/Nhe I)に導入した。こうして作製したプラスミドをhHv b-hLv a/N5KG4P及びhHv c-hLv a/N5KG4Pと命名した。

【0182】

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hv b/CVIDEC、hATR5Hv d/CVIDEC及びhATR5Hv e/CVIDECをNhe I及びSal Iで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、ヒト型化ATR-5抗体L鎖バージョン“b”cDNAの配列を含むプラスミドchHv-hLv b/N5KG4PをNhe I及びSal Iにて消化することにより調製したhLv b/N5KG4P (Sal I/Nhe I)に導入した。こうして作製したプラスミドをhHv b-hLv b/N5KG4P、hHv d-hLv b/N5KG4P及びhHv e-hLv b/N5KG4Pと命名した。

【0183】

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hv f/CVIDEC、hATR5Hv g/CVIDEC及びhATR5Hv h/CVIDECをNhe I及びSal Iで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、ヒト型化ATR-5抗体L鎖バージョン“b”cDNAの配列を含むプラスミドchHv-hLv b/N5KG4PをNhe I及びSal Iにて消化することにより調製したhLv b/N5KG4P (Sal I/Nhe I)に導入した。こうして作製したプラスミドをhHv f-hLv b/N5KG4P、hHv g-hLv b/N5KG4P及びhHv h-hLv b/N5KG4Pと命名した。

【0184】

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hv i/CVIDEC及びhATR5Hv j/CVIDECをNhe I及びSal Iで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、ヒト型化ATR-5抗体L鎖バージョン“b”cDNAの配列を含むプラスミドchHv-hLv b/N5KG4PをNhe I及びSal Iにて消化することにより調製したhLv b/N5KG4P (Sal I/Nhe I)に導入した。こうして作製したプラスミドをhHv i-hLv b/N5KG4P及びhHv j-hLv b/N5KG4Pと命名した。

【0185】

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hvb1/CVIDEC及びhATR5Hvd1/CVIDECをNheI及びSalIで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、ヒト型化ATR-5抗体L鎖バージョン“b”cDNAの配列を含むプラスミドchHv-hLv b/N5KG4PをNheI及びSalIにて消化することにより調製したhLv b/N5KG4P (SalI/NheI) に導入した。こうして作製したプラスミドをhHvb1-hLv b/N5KG4P及びhHvd1-hLv b/N5KG4Pと命名した。

【0186】

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hvb3/CVIDEC及びhATR5Hvd3/CVIDECをNheI及びSalIで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、ヒト型化ATR-5抗体L鎖バージョン“b”cDNAの配列を含むプラスミドchHv-hLv b/N5KG4PをNheI及びSalIにて消化することにより調製したhLv b/N5KG4P (SalI/NheI) に導入した。こうして作製したプラスミドをhHvb3-hLv b/N5KG4P及びhHvd3-hLv b/N5KG4Pと命名した。

【0187】

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hvb/CVIDECをNheI及びSalIで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、ヒト型化ATR-5抗体L鎖バージョン“b1”及び“b2”cDNAの配列を含むプラスミドchHv-hLv b1/N5KG4P及びchHv-hLv b2/N5KG4PをNheI及びSalIにて消化することにより調製したhLv b1/N5KG4P (SalI/NheI) 及びhLv b2/N5KG4P (SalI/NheI) に導入した。こうして作製したプラスミドをhHvb-hLv b1/N5KG4P及びhHvb-hLv b2/N5KG4Pと命名した。

【0188】

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hvi/CVIDECをNheI及びSalIで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、ヒト型化ATR-5抗体L鎖バージョン“b1”及び“b2”cDNAの配列を含むプラスミ

ドc h H v - h L v b 1 / N 5 K G 4 P 及び c h H v - h L v b 2 / N 5 K G 4 P を N h e I 及び S a l I にて消化することにより調製した h L v b 1 / N 5 K G 4 P (S a l I / N h e I) 及び h L v b 2 / N 5 K G 4 P (S a l I / N h e I) に導入した。こうして作製したプラスミドを h H v i - h L v b 1 / N 5 K G 4 P 及び h H v i - h L v b 2 / N 5 K G 4 P と命名した。

【0189】

(4) COS-7細胞へのトランスフェクション

ヒト型化抗体の抗原結合活性及び中和活性を評価するため、前記発現プラスミドをCOS-7細胞で一過性に発現させた。

構築した発現プラスミドベクターをGene Pulser装置(Bio-Rad)を用いてエレクトロポレーションによりCOS-7細胞に形質導入した。PBS中に 1×10^7 細胞/mlの細胞濃度で懸濁されているCOS-7細胞0.78mlに、プラスミド50 μ gあるいは20 μ gを加え、1,500V, 25 μ Fの静電容量にてパルスを与えた。

【0190】

室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を5%のUltra Low IgGウシ胎児血清(GIBCO)を含有するDMEM培地(GIBCO)に懸濁し、10cm培養皿あるいは15cm培養皿を用いてCO₂インキュベーターにて培養した。24時間の培養の後、培養上清を吸引除去し、新たに無血清培地HBCHO(アーバインサイエンティフィック)を加えた。さらに72時間もしくは96時間の培養の後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去した。

【0191】

(5) 抗体の精製

COS-7細胞の培養上清からの抗体の精製をAffiGel Protein A MAPSIIキット(Bio-Rad)、あるいはrProtein A Sepharose Fast Flow(Pharmacia Biotech)を用いて行った。AffiGel Protein A MAPSIIキットを用いた精製はキット添付の処方に従って行った。rProtein A Sepharose Fast Flowを用いた精製は以下のように行った。

【0192】

1 ml の rProtein A Sepharose Fast Flow をカラムに充填し、10 倍量の TBS を流すことによってカラムを平衡化した。平衡化したカラムに COS-7 細胞の培養上清をアプライした後、10 倍量の TBS によってカラムを洗浄した。次に 13.5 ml の 2.5 mM HCl (pH 3.0) を流すことによって吸着した抗体画分をカラムより溶出した。1.5 ml の 1M Tris-HCl (pH 8.0) を加えることによって溶出液を中和した。

精製された抗体画分について、セントリプレップ 30 もしくは 100 (amicon) を用いた限外濾過を 2~3 回行うことにより、TBS に溶媒を置換し、最終的に約 1.5 ml まで濃縮した。

【0193】

参考例 6. 抗体の定量及び活性評価

(1) ELISA による抗体濃度の測定

抗体濃度測定のための ELISA プレートを次のようにして調製した。ELISA 用 96 穴プレート (Maxisorp, NUNC) の各穴を固相化バッファー (0.1M NaHCO_3 、0.02% NaN_3 、pH 9.6) (以下、CB と称す) で $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調製したヤギ抗ヒト IgG γ 抗体 (BioSource) $100 \mu\text{l}$ で固相化し、 $200 \mu\text{l}$ の希釈バッファー (50 mM Tris-HCl、1 mM MgCl_2 、0.1M NaCl、0.05% Tween 20、0.02% NaN_3 、1% ウシ血清アルブミン (BSA)、pH 8.1) (以下 DB と称す) でブロッキングの後、抗体を発現させた COS-7 細胞の培養上清あるいは精製抗体を DB にて段階希釈して各穴に加えた。

【0194】

1 時間室温にてインキュベートし 0.05% Tween 20 を含むダルベッコ PBS (以下 RB と称す) で洗浄後、DB で 1000 倍に希釈したアルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒト IgG γ 抗体 (BioSource) $100 \mu\text{l}$ を加えた。1 時間室温にてインキュベートし RB で洗浄の後、 $1 \text{ mg}/\text{ml}$ となるように Sigma 104 (p-ニトロフェニルリン酸、SIGMA) を基質バッファー (50 mM NaHCO_3 、10 mM MgCl_2 、pH 9.8) に溶解したもの (

以下、基質溶液と称す)を加え、405/655nmでの吸光度をmicroplate reader (Bio Rad) で測定した。濃度測定のスチンダードとしてIgG4κ (The Binding Site) を用いた。

【0195】

(2) 抗原結合能の測定

抗原結合測定のためのCell ELISAプレートは、次のようにして調製した。細胞はヒト膀胱癌細胞J82 (ATCC HTB-1) を用いた。細胞培養用96穴プレートの60穴に 1×10^6 個のJ82細胞を播き込んだ。これをCO₂ インキュベーターで1日培養し(10%の牛胎児血清(GIBCO)を含むRPMI 1640培地)、細胞を接着させた。培養液を捨て、300μlのPBSで各穴を2回洗浄した。4%のパラホルムアルデヒドを含むPBS(以下、PFA/PBSと称す)を各穴に100μl加え、氷上で10分間静置し、細胞を固相化した。

【0196】

PFA/PBSを捨て、300μlのPBSで各穴を2回洗浄後、250μlのDBでブロッキングした。培養上清あるいは精製抗体をDBにて段階希釈して100μlを各穴に加えた。室温にて2時間インキュベートしRBで洗浄後、DBで1000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgGγ抗体(BioSource) 100μlを加えた。室温にて1時間インキュベートしRBで洗浄ののち、基質溶液を加え、次に405/655nmでの吸光度をMicroplate Reader (Bio-Rad) で測定した。

【0197】

(3) 中和活性の測定

マウス抗体、キメラ抗体及びヒト型化抗体の中和活性は、ヒト胎盤由来トロンボプラスチン、Thromborel S(Behringwerke AG) によるFactor Xa産生阻害活性を指標に測定した。すなわち、1.25mg/mlのThromborel S 10μlと適当な濃度に希釈した抗体10μlに緩衝液(5mMのCaCl₂、0.1%のBSAを含むTBS) 60μlを加え、96穴プレート中で室温で1時間反応させた。これに3.245μg/mlのヒトファクターX(セルサス・ラボラトリ

ーズ) 及び 82.5 ng/ml のヒトファクター VIIa (エンザイム・リサーチ) をそれぞれ 10 μ l 加え、さらに室温で 1 時間反応させた。

【0198】

0.5M の EDTA を 10 μ l 加え、反応を停止させた。これに発色基質溶液を 50 μ l 加え、Microplate Reader (Bio Rad) で 405/655 nm の吸光度を測定した。室温で 1 時間反応させ、再度 405/655 nm の吸光度を測定した。抗体無添加の 1 時間の吸光度変化を 100% の活性とし、それぞれの吸光度変化から残存活性 (%) を算出した。

発色基質溶液はテストチーム発色基質 S-2222 (Chromogenix) を添付文書に従い溶解し、精製水で 2 倍希釈した後、ポリブレン液 (0.6 mg/ml ヘキサジメチリンブロマイド、SIGMA) と 1:1 で混和し調製した。

【0199】

(4) 活性の評価

(i) ヒト型化 H 鎖バージョン “a” とキメラ L 鎖との組合せ

ヒト型化 H 鎖バージョン “a” とキメラ L 鎖を組み合わせた抗体 (a-ch) を作製し、cell ELISA にて抗原結合能を調べたところ、高濃度側で抗原に対する結合量が低下していた。FXa 産生阻害による抗原中和能についても陽性対照のキメラ抗体 (ch-ch) に比べて弱い活性であった。よってヒト型化 H 鎖は FR-シャッフリングによるバージョンアップを行うことにした。なお、ここで用いたキメラ抗体は COS-7 細胞で発現させ精製した抗体を用い評価したものである。

【0200】

(ii) ヒト型化 L 鎖バージョン “a” とキメラ H 鎖との組合せ

ヒト型化 L 鎖バージョン “a” とキメラ H 鎖を組み合わせた抗体 (ch-a) を作製し、cell ELISA にて抗原結合能を調べたところ、キメラ抗体と同等以上の抗原結合活性が認められた。一方、抗原中和能は陽性対照のキメラ抗体に比べて弱い活性であった。よってヒト型化 L 鎖も FR-シャッフリングによるバージョンアップを行うことにした。なお、ここで用いたキメラ抗体は COS

ー7細胞で発現させ精製した抗体を用い評価したものである。

【0201】

(iii) ヒト型化H鎖バージョン“a”とヒト型化L鎖バージョン“a”との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン“a”とヒト型化L鎖バージョン“a”を組み合わせた抗体(a-a)を作製し、cell ELISAにて抗原結合能を調べたところ、高濃度側で抗原に対する結合量が低下していた。FXa産生阻害による抗原中和能についても陽性対照のキメラ抗体に比べてかなり弱い活性であった。よってヒト型化H鎖及びL鎖のFR-シャッフリングによるバージョンアップを行うことにした。なお、ここで用いたキメラ抗体はCOS-7細胞で発現させ精製した抗体を用い評価したものである。

【0202】

(iv) ヒト型化H鎖バージョン“b”、“c”及び“d”とキメラL鎖との組合せ

FR-シャッフリングによってバージョンアップしたヒト型化H鎖とキメラL鎖を組み合わせた抗体(それぞれ“b-ch”、“c-ch”、及び“d-ch”)を作製し、cell ELISAにて抗原結合能を調べたところ、“d-ch”はキメラ抗体と同等の抗原結合活性が認められ、“b-ch”及び“c-ch”はわずかに劣る抗原結合活性を示した。一方、抗原中和能は陽性対照のキメラ抗体に比べて、“b-ch”はほぼ同等、“d-ch”はわずかに弱い活性であった。またバージョン“c-ch”はキメラ抗体に比べかなり弱い活性であった。よってヒト型化H鎖バージョン“b”及び“d”がヒト型化H鎖で高い活性を示すと考えられるバージョンであった。

【0203】

(v) ヒト型化H鎖バージョン“b”とヒト型化L鎖バージョン“a”との組合せ

FR-シャッフリングによってバージョンアップしたヒト型化H鎖バージョン“b”とヒト型化L鎖バージョン“a”を組み合わせた抗体(b-a)を作製し、cell ELISAにて抗原結合能を調べたところ、高濃度で抗原に対する

結合量が低下していた。一方、抗原中和能は陽性対照のキメラ抗体に比べて、かなり弱い活性であった。よって“b-a”が“a-a”より高い活性を示すバージョンであった。なお、ここで用いたキメラ抗体はC O S-7細胞で発現させ精製した抗体を用い評価したものである。

【0204】

(v i) ヒト型化L鎖バージョン“b”、“c”とキメラH鎖との組合せ

ヒト型化L鎖バージョン“b”及び“c”をキメラH鎖と組み合わせた抗体（それぞれ、“c h-b”、“c h-c”）を作製したところ、いずれの抗体も抗原結合能、抗原中和能ともにキメラ抗体と同等の活性を示した。よってバージョン“b”及び“c”をヒト型化抗体L鎖の候補とした。マウス抗体由来のアミノ酸残基数が1つ少ないバージョン“b”の方がバージョン“c”より抗原性の点で優れていると考えられる。なお、ここで用いたキメラ抗体はC H O細胞D G 44で発現させ精製した抗体を用い評価したもので、これ以降の評価でもこの抗体を陽性対照に用いた。

【0205】

(v i i) ヒト型化H鎖バージョン“b”とヒト型化L鎖バージョン“b”及び“c”との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン“b”をヒト型化L鎖バージョン“b”及び“c”と組み合わせた抗体（それぞれ“b-b”及び“b-c”）を作製し、抗原結合能及び抗原中和能を測定した。いずれの抗体も抗原結合能、抗原中和能ともにキメラ抗体よりわずかに劣る活性を示した。

【0206】

(v i i i) ヒト型化H鎖バージョン“b”及び“d”とヒト型化L鎖バージョン“b”との組合せ

F R-シャッフリングによってバージョンアップしたヒト型化H鎖とヒト型化L鎖バージョン“b”を組み合わせた抗体（それぞれ“b-b”及び“d-b”）を作製し、c e l l E L I S Aにて抗原結合能を調べたところ、“d-b”はキメラ抗体と同等の抗原結合活性が認められ、“b-b”は高濃度でわずかに劣る抗原結合活性を示した。一方、抗原中和能は陽性対照のキメラ抗体に比べて

、“b-b”はわずかに弱い活性で、“d-b”はキメラ抗体に比べかなり弱い活性であった。よって“b-b”は抗原活性中和能の高いバージョン、“d-b”は抗原結合能の高いバージョンであることが示された。

【0207】

(ix) ヒト型化H鎖バージョン“e”とキメラL鎖及びヒト型化L鎖バージョン“b”との組合せ

ヒト型化L鎖バージョン“e”をキメラL鎖及びヒト型化バージョン“b”と組み合わせた抗体（それぞれ“e-ch”及び“e-b”）を作製したところ、“e-ch”の抗原結合能はキメラ抗体と同等の活性を示したが、“e-b”は抗体の発現量が非常に低く、且つ抗原結合能も殆ど喪失していた。また“e-ch”の抗原活性中和能はキメラ抗体に比べかなり弱い活性であった。よってH鎖バージョン“e”はL鎖バージョン“b”との組合せが悪いと考えられた。

【0208】

(x) ヒト型化H鎖バージョン“f”、“g”及び“h”とヒト型化L鎖バージョン“b”との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン“f”、“g”及び“h”をヒト型化L鎖バージョン“b”と組み合わせた抗体を（それぞれ“f-b”、“g-b”及び“h-b”）作製したところ、“f-b”及び“h-b”の抗体は抗体の発現量が非常に低かった。なお、バージョン“f”、“h”についてはキメラL鎖と組み合わせた抗体も作製したが、発現されなかった。“g-b”は低い濃度から飽和状態に達し、キメラ抗体より弱い抗原結合能を示した。“g-b”の抗原中和能は、キメラ抗体に比べかなり弱い活性であった。

【0209】

(xi) ヒト型化H鎖バージョン“b1”及び“d1”とヒト型化L鎖バージョン“b”との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン“b1”及び“d1”をヒト型化L鎖バージョン“b”と組み合わせた抗体を（それぞれ“b1-b”及び“d1-b”）作製したところ、ともに抗体は殆ど発現されなかった。なお、これらについてはキメラL鎖と組み合わせた抗体も作製したが、発現されなかった。

【0 2 1 0】

(x i i) ヒト型化H鎖バージョン“b 3”及び“d 3”とヒト型化L鎖バージョン“b”との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン“b 3”及び“d 3”をヒト型化L鎖バージョン“b”と組み合わせた抗体を（それぞれ“b 3 - b”及び“d 3 - b”）作製したところ、“d 3 - b”の抗原結合能はキメラ抗体よりわずかに劣っており、“b 3 - b”の抗原結合能はさらに劣っていた。“b 3 - b”の抗原中和能は“b - b”より上回る活性を示したものの、キメラ抗体の活性には及ばず、“d 3 - b”は“b - b”と同程度の活性にとどまった。

【0 2 1 1】

(x i i i) ヒト型化H鎖バージョン“i”及び“j”とキメラL鎖及びヒト型化L鎖バージョン“b”との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン“i”及び“j”をキメラL鎖と組み合わせた抗体（それぞれ“i - c h”及び“j - c h”）とヒト型化L鎖バージョン“b”と組み合わせた抗体（それぞれ“i - b”及び“j - b”）を作製し、抗原結合能及び抗原中和能を測定した。抗原結合能はいずれの抗体もキメラ抗体とほぼ同等の活性を示した。“i - c h”にはキメラ抗体の活性を上回る抗原中和能が認められ、“j - c h”の抗原中和能はキメラ抗体に比べかなり弱い活性であった。“i - b”はキメラ抗体と同等の活性が認められ、“j - b”はキメラ抗体に比べかなり弱い活性であった。

【0 2 1 2】

(x i v) ヒト型化L鎖バージョン“b 1”及び“b 2”

ヒト型化L鎖バージョン“b 1”及び“b 2”をキメラH鎖と組み合わせた抗体（それぞれ、“c h - b 1”及び“c h - b 2”）を作製したところ、いずれの抗体もキメラ抗体と同等の抗原結合能を示した。抗原中和能については、“c h - b 1”ではキメラ抗体と同等の活性を示し、“c h - b 2”では高濃度側でキメラ抗体を若干上回る活性が認められた。バージョン“b 1”及び“b 2”ともにヒト型化抗体L鎖の候補になり得るが、より強い活性を有するという点でバージョン“b 2”の方が優れている。

【0213】

(xv) ヒト型化H鎖バージョン“b”とヒト型化L鎖バージョン“b2”との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン“b”をヒト型化L鎖バージョン“b2”と組み合わせた抗体(“b-b2”)を作製し、抗原結合能及び抗原中和能を測定した。抗原結合能はキメラ抗体よりわずかに劣っていた。抗原中和能は“b-b”の活性を上回ったものの、“i-b”の活性には及ばなかった。

【0214】

(xvi) ヒト型化H鎖バージョン“i”とヒト型化L鎖バージョン“b1”又は“b2”との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン“i”をヒト型化L鎖バージョン“b1”又は“b2”と組み合わせた抗体(それぞれ“i-b1”及び“i-b2”)を作製し、抗原結合能及び抗原中和能を測定した。“i-b2”の抗原結合能はキメラ抗体とほぼ同等で、“i-b1”はわずかに劣る程度であった。また、“i-b1”及び“i-b2”の抗原中和能はキメラ抗体や“i-b”を上回る活性を示し、“i-b2” > “i-b1”の順に強かった。

【0215】

参考例 7. CHO細胞産生ヒト型化抗体の作製及び活性評価

(1) CHO安定産生細胞株の樹立

ヒト型化抗体(b-b、i-b及びi-b2)の安定産生細胞株を樹立するため、無血清培地に馴化したCHO細胞(DG44)に抗体発現遺伝子ベクターを導入した。

【0216】

プラスミドDNA、hHvb-hLv b/N5KG4P、hHvi-hLv b/N5KG4P及びhHvi-hLv b2/N5KG4Pを制限酵素SspI(宝酒造)で切断して直鎖状にし、フェノール及びクロロフォルム抽出した後、エタノール沈殿により精製した。エレクトロポレーション装置(Gene Pulser; Bio Rad)により、直鎖状にした発現遺伝子ベクターをDG44細胞に導入した。DG44細胞をPBSに 1×10^7 /mlの細胞密度で懸濁

し、この懸濁液約 0.8 ml に前記の DNA を 10 もしくは 50 μ g を加え、1,500 V, 25 μ F の静電容量にてパルスを与えた。

【0217】

室温にて 10 分間の回復期間の後、ヒポキサンチン-チミジン (GIBCO) (以下、HT) を含有する CHO-S-SFMII 培地に処理された細胞を懸濁し、2 枚の 96 穴平底プレート (Falcon) に 100 μ l/穴となるように播種し、CO₂ インキュベーターにて培養した。培養開始 8~9 時間後に HT 及び 1 mg/ml の GENETICIN (GIBCO) を含有する CHO-S-SFMII 培地を 100 μ l/穴加え、500 μ g/ml の GENETICIN 選択培地に変換し、抗体遺伝子の導入された細胞を選択した。3~4 日に一度 1/2 量の培地を新鮮な培地と交換し、選択培地への変換から約 2 週間経過した時点で、その 4~5 日後に細胞の順調な増殖が観察された穴の培養上清の一部を回収した。この培養上清中に発現された抗体濃度を前述の抗体濃度測定 ELISA により測定し、抗体産生量の高い細胞を選出した。

【0218】

(2) ヒト型化抗体の大量精製

前記のように選出したヒト型化抗体 (“b-b”、“i-b”及び “i-b2”) 発現 DG44 細胞株を 2 L ローターボトル (CONING) を用い、500 ml/ボトルの CHO-S-SFMII 培地中で数日培養後、培養液を回収して新鮮な CHO-S-SFMII 培地を加え、再び培養した。培養液は遠心分離により細胞破片を除去し、0.22 μ m もしくは 0.45 μ m のフィルターで濾過した。これを繰り返し、それぞれ全量約 2 L の培養上清を得た。得られた培養上清を Protein A アフィニティーカラム (Poros) を接続した ConSep LC100 システム (ミリポア) にて抗体を精製した。

【0219】

(3) ELISA による抗体濃度の測定

抗体濃度測定のための ELISA プレートを次のようにして調製した。ELISA 用 96 穴プレート (Maxisorp, NUNC) の各穴を CB で 1 μ g/ml の濃度に調製したヤギ抗ヒト IgG γ 抗体 (BioSource) 100 μ l で固相化し、200 μ

1のDBでブロッキングの後、抗体を発現させたCOS細胞の培養上清あるいは精製抗体をDBにて段階希釈して各穴に加えた。

【0220】

1時間室温にてインキュベートしRBで洗浄後、DBで1000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG γ 抗体(BioSource) 100 μ lを加えた。1時間室温にてインキュベートしRBで洗浄の後、基質溶液を100 μ l加え、405/655nmでの吸光度をmicroplate reader(Bio Rad)で測定した。濃度測定のスタンドードとしてIgG4 κ (The Binding Site)を用いた。

【0221】

(4) 抗原結合能の測定

抗原結合測定のためのCell ELISAプレートでは、次のようにして調製した。細胞はヒト膀胱癌細胞J82(ATCC HTB-1)を用いた。細胞培養用96穴プレートに 1×10^6 個のJ82細胞を播き込んだ。これをCO₂インキュベーターで1日培養し(10%の牛胎児血清(GIBCO)を含むRPMI 1640培地)、細胞を接着させた。培養液を捨て、PBSで各穴を2回洗浄した。PFA/PBSを各穴に100 μ l加え、氷上で10分間静置し、細胞を固相化した。

【0222】

PFA/PBSを捨て、300 μ lのPBSで各穴を2回洗浄後、250 μ lのDBでブロッキングした。精製抗体を上測定結果をもとに、DBにて10 μ g/mlより公比2で段階希釈して100 μ lを各穴に加えた。室温にて2時間インキュベートしRBで洗浄後、DBで1000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG γ 抗体(BioSource) 100 μ lを加えた。室温にて1時間インキュベートしRBで洗浄ののち、基質溶液を100 μ l加え、次に405/655nmでの吸光度をMicroplate Reader (Bio-Rad)で測定した。

【0223】

(5) TF中和活性(ファクターXa産生阻害活性)の測定

ヒト型化抗体のファクターXa産生阻害活性は、ヒト胎盤由来トロンボプラス

チン、Thromborel S(Behringwerke AG) による Factor Xa産生阻害活性を指標に測定した。すなわち、5 mg/ml のThromborel S 10 μ l と抗体 10 μ l に緩衝液 (5 mM のCaCl₂、0.1% のBSAを含むTBS) 60 μ l を加え、96穴プレート中で室温で1時間反応させた。抗体は緩衝液で200 μ g/ml より公比5で段階希釈した。

【0224】

これに3.245 μ g/ml のヒトファクターX (セルサス・ラボラトリーズ) 及び82.5 ng/ml のヒトファクターVIIa (エンザイム・リサーチ) をそれぞれ10 μ l 加え、さらに室温で45分間反応させた。0.5M のEDTAを10 μ l 加え、反応を停止させた。これに発色基質溶液を50 μ l 加え、Microplate Reader (Bio Rad) で405/655 nmの吸光度を測定した。室温で30分間反応させ、再度405/655 nmの吸光度を測定した。抗体無添加の30分間の吸光度変化を100%の活性とし、それぞれの吸光度変化から残存活性(%)を算出した。

発色基質溶液はテストチーム発色基質S-2222 (Chromogenix) を添付文書に従い溶解し、ポリブレン液 (0.6 mg/ml ヘキサジメチリンブロマイド、SIGMA) と1:1で混和し調製した。

【0225】

(6) TF中和活性 (ファクターX結合阻害活性) の測定

ヒト型化抗体のファクターX結合阻害活性は、ヒト胎盤由来トロンボプラスチン、Thromborel S(Behringwerke AG) を用い、予めTFとFactor VIIaの複合体を形成させ、その複合体のFactor Xa産生阻害活性を指標にファクターX結合阻害活性を測定した。すなわち、5 mg/ml のThromborel S 10 μ l と82.5 ng/ml のヒトFactor VIIa (エンザイム・リサーチ) 10 μ l に緩衝液 (5 mM のCaCl₂、0.1% のBSAを含むTBS) 60 μ l を加え、96穴プレート中で室温で予め1時間反応させた。

【0226】

これに抗体溶液を10 μ l 加え、室温で5分間反応させた後、3.245 μ g/ml のヒトFactor X (セルサス・ラボラトリーズ) を10 μ l 加え、

さらに室温で45分間反応させた。なお抗体は緩衝液で $200\mu\text{g}/\text{ml}$ より公比2で段階希釈した。0.5MのEDTAを $10\mu\text{l}$ 加え、反応を停止させた。これに発色基質溶液を $50\mu\text{l}$ 加え、Microplate Reader (Bio Rad) で $405/655\text{nm}$ の吸光度を測定した。室温で30分間反応させ、再度 $405/655\text{nm}$ の吸光度を測定した。抗体無添加の30分間の吸光度変化を100%の活性とし、それぞれの吸光度変化から残存活性(%)を算出した。

発色基質溶液はテストチーム発色基質S-2222 (Chromogenix) を添付文書に従い溶解し、ポリブレン液($0.6\text{mg}/\text{ml}$ ヘキサジメチリンブロマイド、SIGMA)と1:1で混和し調製した。

【0227】

(7) TF中和活性(血漿凝固阻害活性)の測定

ヒト型化抗体のTF中和活性(血漿凝固阻害活性)はヒト胎盤由来トロンボプラスチン、Thromborel S (Behringwerke AG) を用いたプロトロンビン時間を指標に測定した。すなわち、サンプルカップにヒト血漿(コスモ・バイオ) $100\mu\text{l}$ を入れ、これに様々な濃度に希釈した抗体を $50\mu\text{l}$ 加え、 37°C で3分間加温した。予め 37°C に加温しておいた $1.25\text{mg}/\text{ml}$ のThromborel Sを $50\mu\text{l}$ 加え、血漿凝固を開始させた。この凝固時間はAmelung CR-Aを接続したAmelung KC-10A (ともにエム・シー・メディカル) にて測定した。

【0228】

抗体は $80\mu\text{g}/\text{ml}$ より公比2で0.1%のBSAを含有するTBS (以下、BSA-TBS) にて段階希釈した。測定した抗体無添加の凝固時間を100%のTF血漿凝固活性とし、Thromborel Sの濃度と凝固時間をプロットした検量線により抗体を添加した際のそれぞれの凝固時間からTF残存活性を算出した。

検量線は様々なThromborel Sの濃度とその凝固時間を測定することにより作成した。適当に希釈したThromborel S、 $50\mu\text{l}$ に $50\mu\text{l}$ のBSA-TBSを加え、 37°C で3分間加温し、予め 37°C に加温しておいたヒト血漿を $100\mu\text{l}$ 加えて凝固を開始させ凝固時間を測定した。Thromborel Sは $6.25\text{mg}/\text{ml}$ より公比2で25mMのCaCl₂を含むハネクス緩衝液(GIBCO)にて段

階希釈した。横軸にThromborel S濃度、縦軸に凝固時間を両対数グラフにプロットし、これを検量線とした。

【0229】

(8) 活性の評価

“b-b”、“i-b”及び“i-b2”のヒト型化抗体すべてはキメラ抗体と同等以上の活性を有していた(図1)。Factor Xa産生阻害活性、Factor X結合阻害活性及び血漿凝固阻害活性においても、ヒト型化抗体“b-b”、“i-b”及び“i-b2”はキメラ抗体と同等以上の活性を有しており、“i-b2” > “i-b” > “b-b”の順に活性が強かった(図2、3及び4)。

【 0 2 3 0 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Prophylactic or therapeutic agent for diseases having a sustained
coagulation stimulatory state

<130> 994124

<160> 104

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer MHC-G1

<400> 1

ggatcccggg ccagtggata gacagatg

28

【 0 2 3 1 】

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer MKC

<400> 2

ggatcccggg tggatggtgg gaagatg

27

【 0 2 3 2 】

<210> 3

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> M13 Primer M4

<400> 3

gttttcccag tcacgac

17

【 0 2 3 3 】

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> M13 Primer RV

<400> 4

caggaaacag ctatgac

17

【 0 2 3 4 】

<210> 5

<211> 408

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(408)

<223> Nucleotide sequence coding for H chain V region of anti-TF mouse monoclonal antibody ATR-5

<400> 5

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg	48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly	
-15 -10 -5	
gtc aat tca gag gtt cag ctg cag cag tct ggg act aac ctt gtg agg	96
Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Asn Leu Val Arg	
1 5 10	
cca ggg gcc tta gtc aag ttg tcc tgc aaa ggt tct ggc ttc aac att	144
Pro Gly Ala Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn Ile	
15 20 25	
aaa gac tac tat atg cac tgg gtg aag cag agg cct gaa cag ggc ctg	192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
gag tgg att gga ggg aat gat cct gcg aat ggt cat agt atg tat gac	240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp	
50 55 60	
ccg aaa ttc cag ggc aag gcc agt ata aca gca gac aca tcc tcc aac	288
Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Ser Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn	
65 70 75	
aca gcc tac ctg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac act gcc gtc	336
Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
tat ttc tgt gct aga gac tcg ggc tat gct atg gac tac tgg ggt caa	384
Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln	
95 100 105	
gga acc tca gtc acc gtc tcc tca	408
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser	
110 115	

【 0 2 3 5 】

<210> 6

<211> 381

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(60)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (61)...(381)

<223> Nucleotide sequence coding for L chain V region of anti-TF mouse monoclonal antibody ATR-5

<400> 6

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca 48

Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro

-20 -15 -10 -5

ggt atc aga tgt gac atc aag atg acc cag tct cca tcc tct atg tat 96

Gly Ile Arg Cys Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr

1 5 10

gca tcg ctg gga gag aga gtc act atc act tgc aag gcg agt cag gac 144

Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp

15 20 25

att aaa agc ttt tta agt tgg tac cag caa aaa cca tgg aaa tct cct 192

Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Trp Lys Ser Pro

30 35 40

aag acc ctg atc tat tat gca aca agc ttg gca gat ggg gtc cca tca 240

Lys Thr Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser

45 50 55 60

aga ttc agt ggc agt gga tct ggg caa gat tat tct cta acc atc aac 288

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn

65

70

75

aac ctg gag tct gac gat aca gca act tat tat tgt cta cag cat ggt 336

Asn Leu Glu Ser Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly

80

85

90

gag agc ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa 381

Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

95

100

105

【 0 2 3 6 】

<210> 7

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer ch5HS

<400> 7

gtctgtcgac ccaccatgaa atgcagctgg gtcac

35

【 0 2 3 7 】

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer ch5HA

<400> 8

tgttgctagc tgaggagacg gtgactga

28

【 0 2 3 8 】

<210> 9

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer ch5LS

<400> 9

gtctagatct ccaccatgag ggcccctgct cagtt

35

【 0 2 3 9 】

<210> 10

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer ch5LA

<400> 10

tgttcgtacg ttttatttcc agcttggt

28

【 0 2 4 0 】

<210> 11

<211> 104

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR grafting primer hr5Hv1S

<400> 11

ttctgtcgac ccaccatgaa atgcagctgg gtcattcttct tcctgatggc agtggttaca 60

ggggttaact cacaggtgca gctgttggag tctggagctg tgct

104

【 0 2 4 1 】

<210> 12

<211> 108

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR grafting primer hR5Hv28

<400> 12

acagggtgcag ctgttggagt ctggagctgt gctggcaagg cctgggactt ccgtgaagat 60

ctcctgcaag gcttccggat tcaacattaa agactactat atgcattg 108

【 0 2 4 2 】

<210> 13

<211> 108

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR grafting primer hR5Hv4S

<400> 13

gaatggccat agtatgtatg acccgaaatt ccagggcagg gccaaactga ctgcagccac 60

atccgccagt attgcctact tggagttctc gagcctgaca aatgagga 108

【 0 2 4 3 】

<210> 14

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR grafting primer hR5Hv3A

<400> 14

tcatacatatc tatggccatt cgcaggatca ttcccaccaa tccattctag accctgtcca 60

ggcctctgtt ttacccaatg catatagtag tctttaatgt tgaatccgga 110

【 0 2 4 4 】

<210> 15

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR grafting primer hR5Hv5A

<400> 15

agaagctagc tgaggagacg gtgaccaggg tgccttggcc ccagtagtcc atggcatagc 60

ccgagtctct tgcacagtaa tagaccgcag aatcctcatt tgcaggctc 110

【 0 2 4 5 】

<210> 16

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer hR5HvPrS

<400> 16

ttctgtcgac ccaccatga 19

【 0 2 4 6 】

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer hR5HvPrA

<400> 17

agaagctagc tgaggagac 19

【 0 2 4 7 】

<210> 18

<211> 415

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(415)

<223> Nucleotide sequence coding for version "a" of humanized H chain V region

<400> 18

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240

Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50

55

60

ccg aaa ttc cag ggc agg gcc aaa ctg act gca gcc aca tcc gcc agt 288

Pro Lys Phe Gln Gly Arg Ala Lys Leu Thr Ala Ala Thr Ser Ala Ser

65

70

75

att gcc tac ttg gag ttc tcg agc ctg aca aat gag gat tct gcg gtc 336
 Ile Ala Tyr Leu Glu Phe Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val
 80 85 90
 tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95 100 105
 ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 415
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 110 115

【 0 2 4 8 】

<210> 19

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "a" of humanized H chain V region

<400> 19

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Ala Lys Leu Thr Ala Ala Thr Ser Ala Ser Ile Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Glu Phe Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

【 0 2 4 9 】

<210> 20

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3RFFS

<400> 20

ttcttgcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggccg agtcacaatc actgcagaca 60

catccacgaa cacagcctac atggagctct cgagtctgag 100

【 0 2 5 0 】

<210> 21

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3RFBS

<400> 21

ggagctctcg agtctgagat ctgaggacac agccatttat tactgtgcaa gagactcggg 60

ctatgccatg gttct 75

【 0 2 5 1 】

<210> 22

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3RFFA

<400> 22

ctcagactcg agagctccat gtaggctgtg ttcgtggatg tgtctgcagt gattgtgact 60

cggccctgga atttcgggtc atacatacta tggccaagaa 100

【 0 2 5 2 】

<210> 23

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3RFBA

<400> 23

agaaccatgg catagcccga gtctcttgca cagtaataaa tggctgtgtc ctcagatctc 60

agactcgaga gctcc 75

【 0 2 5 3 】

<210> 24

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3NMFS

<400> 24

ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggccg agtcacaatg ctggtagaca 60

catccaagaa ccagttctcc ctgaggctct cgagtgtgac 100

【 0 2 5 4 】

<210> 25

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3NMBS

<400> 25

gaggctctcg agtgtgacag ccgcggacac agccgtatat tactgtgcaa gagactcggg 60
ctatgccatg gttct 75

【 0 2 5 5 】

<210> 26

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3NMFA

<400> 26

gtcacactcg agagcctcag ggagaactgg ttcttggatg tgtctaccag cattgtgact 60
cggccctgga atttcgggtc atacatacta tggccaagaa 100

【 0 2 5 6 】

<210> 27

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3NMBA

<400> 27

agaaccatgg catagcccga gtctcttgca cagtaatata cggctgtgtc cgcggtgtc 60
acactcgaga gcctc 75

【 0 2 5 7 】

<210> 28

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "b" of humanized H chain V region

<400> 28

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240

Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50

55

60

ccg aaa ttc cag ggc cga gtc aca atc act gca gac aca tcc acg aac 288

Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn

65

70

75

aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac aca gcc att 336

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile

80

85

90

tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc

414

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

【 0 2 5 8 】

<210> 29

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "b" of humanized H chain V region

<400> 29

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

【 0 2 5 9 】

<210> 30

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "c" of humanized H chain V region

<400> 30

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192
 Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 30 35 40 45
 gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240
 Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
 50 55 60
 ccg aaa ttc cag ggc cga gtc aca atg ctg gta gac aca tcc aag aac 288
 Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75
 cag ttc tcc ctg agg ctc tcg agt gtg aca gcc gcg gac aca gcc gta 336
 Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
 80 85 90
 tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95 100 105
 ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 110 115

【 0 2 6 0 】

<210> 31

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "c" of humanized H chain V region

<400> 31

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser

65

70

75

80

Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

【 0 2 6 1 】

<210> 32

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3EPS

<400> 32

ttcttgcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcag agtcacgatt actgcggacg 60

aatccacgag cacagcctac atggagctct cgagtctgag 100

【 0 2 6 2 】

<210> 33

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3EPA

<400> 33

agaaccatgg catagcccga gtctctcgca cagaaatata cggccgagtc ctcagatctc 60

agactcgaga gctcc 75

【 0 2 6 3 】

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer F3PrS

<400> 34

ttcttggcca tagtatgtat 20

【 0 2 6 4 】

<210> 35

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer F3PrA

<400> 35

agaaccatgg catagccc 18

【 0 2 6 5 】

<210> 36

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3vHS

<400> 36

ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcag agtctcgatt accgcggacg 60
agtcaacgaa gatagcctac atggagctca acagtctgag 100

【 0 2 6 6 】

<210> 37

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3vHA

<400> 37

agaaccatgg catagcccga gtctctcgca cagaaataaa cggccgtgtc ctcagatctc 60
agactgttga gctcc 75

【 0 2 6 7 】

<210> 38

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "d" of humanized H chain V region

<400> 38

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg	48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly	
-15 -10 -5	
gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg	96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg	
1 5 10	
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att	144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile	
15 20 25	
aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta	192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac	240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp	
50 55 60	
ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att act gcg gac gaa tcc acg agc	288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser	
65 70 75	
aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac tcg gcc gta	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val	
80 85 90	
tat ttc tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa	384
Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln	
95 100 105	
ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc	414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser	
110 115	

【0 2 6 8】

<210> 39

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "d" of humanized H chain

<400> 39

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

【0 2 6 9】

<210> 40

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "e" of humanized H chain V region

<400> 40

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg	48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly	
-15 -10 -5	
gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg	96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg	
1 5 10	
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att	144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile	
15 20 25	
aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta	192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac	240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp	
50 55 60	
ccg aaa ttc cag ggc aga gtc tcg att acc gcg gac gag tca acg aag	288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Lys	
65 70 75	
ata gcc tac atg gag ctc aac agt ctg aga tct gag gac acg gcc gtt	336
Ile Ala Tyr Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80 85 90	

tat ttc tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384
Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

【 0 2 7 0 】

<210> 41

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "e" of humanized H chain V region

<400> 41

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Lys Ile Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

【 0 2 7 1 】

<210> 42

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3SSS

<400> 42

ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcag agtcacgatt accgcggaca 60
catccacgag cacagcctac atggagctca ggagcctgag 100

【 0 2 7 2 】

<210> 43

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3SSA

<400> 43

agaaccatgg catagcccga gtctctcgca cagtaataca cggccgtgtc gtcagatctc 60
aggctcctga gctcc 75

【 0 2 7 3 】

<210> 44

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3CDS

<400> 44

ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcaa agccactctg actgcagacg 60
aatcctccag cacagcctac atgcaactct cgagcctacg 100

【 0 2 7 4 】

<210> 45

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3CDA

<400> 45

agaaccatgg catagcccga gtctcttgca caagaataga ccgcagagtc ctcagatcgt 60
aggctcgaga gttgc 75

【 0 2 7 5 】

<210> 46

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "f" of humanized H chain V
region

<400> 46

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg	48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly	
-15 -10 -5	
gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg	96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg	
1 5 10	
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att	144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile	
15 20 25	
aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta	192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac	240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp	
50 55 60	
ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac aca tcc acg agc	288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser	
65 70 75	
aca gcc tac atg gag ctc agg agc ctg aga tct gac gac acg gcc gtg	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
tat tac tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln	
95 100 105	
ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc	414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser	
110 115	

【0 2 7 6】

<210> 47

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "f" of humanized H chain V region

<400> 47

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

【0 2 7 7】

<210> 48

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "g" of humanized H chain V region

<400> 48

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240

Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50

55

60

ccg aaa ttc cag ggc aaa gcc act ctg act gca gac gaa tcc tcc agc 288

Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser

65

70

75

aca gcc tac atg caa ctc tcg agc cta cga tct gag gac tct gcg gtc 336

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val

80

85

90

tat tct tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384
Tyr Ser Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95 100 105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110 115

【0 2 7 8】

<210> 49

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "g" of humanized H chain V region

<400> 49

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Ser Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

【 0 2 7 9 】

<210> 50

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3ADS

<400> 50

ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggccg cgtcaccatg tcagccgaca 60
agtcctccag cgccgcctat ttacagtgga ccagccttaa 100

【 0 2 8 0 】

<210> 51

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3ADA

<400> 51

agaaccatgg catagcccga gtctctcgcg cagaaatata tggcgggtgc cgaggcctta 60
aggctggtcc actgt 75

【 0 2 8 1 】

<210> 52

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "h" of humanized H chain

<400> 52

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240

Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50

55

60

ccg aaa ttc cag ggc cgc gtc acc atg tca gcc gac aag tcc tcc agc 288

Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser

65

70

75

gcc gcc tat tta cag tgg acc agc ctt aag gcc tcg gac acc gcc ata 336

Ala Ala Tyr Leu Gln Trp Thr Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile

80

85

90

tat ttc tgc gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384

Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc

414

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

【 0 2 8 2 】

<210> 53

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "h" of humanized H chain V region

<400> 53

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Met Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Trp Thr Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

【 0 2 8 3 】

<210> 54

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3MMS

<400> 54

ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcag agtcacgatt accgcggaca 60

catcgacgag cacagtcttc atggaactga gcagcctgag 100

【 0 2 8 4 】

<210> 55

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3MMA

<400> 55

agaaccatgg catagcccga gtctctcgca cagtaataca cggccgtgtc ttcagatctc 60

aggctgctca gttcc 75

【 0 2 8 5 】

<210> 56

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3BMS

<400> 56

ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcag agtcaccttt accgcggaca 60
catccgcgaa cacagcctac atggagttga ggagcctcag 100

【 0 2 8 6 】

<210> 57

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3BMA

<400> 57

agaaccatgg catagcccgga gtctctcgca caataataaa cagccgtgtc tgcagatctg 60
aggctcctca actcc 75

【 0 2 8 7 】

<210> 58

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "i" of humanized H chain V region

<400> 58

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg	48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly	
-15 -10 -5	
gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg	96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg	
1 5 10	
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att	144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile	
15 20 25	
aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta	192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac	240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp	
50 55 60	
ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac aca tcg acg agc	288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser	
65 70 75	
aca gtc ttc atg gaa ctg agc agc ctg aga tct gaa gac acg gcc gtg	336
Thr Val Phe Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
tat tac tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln	
95 100 105	
ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc	414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser	
110 115	

【0 2 8 8】

<210> 59

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "i" of humanized H chain V region

<400> 59

Gln	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Ala	Val	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Thr
1				5						10				15	
Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Tyr
			20						25					30	
Tyr	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40						45		
Gly	Gly	Asn	Asp	Pro	Ala	Asn	Gly	His	Ser	Met	Tyr	Asp	Pro	Lys	Phe
	50					55					60				
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Phe
65				70					75					80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Asp	Ser	Gly	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
		100						105						110	
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser									

115

【0 2 8 9】

<210> 60

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "j" of humanized H chain V region

<400> 60

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg	48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly	
-15 -10 -5	
gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg	96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg	
1 5 10	
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att	144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile	
15 20 25	
aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta	192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac	240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp	
50 55 60	
ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acc ttt acc gcg gac aca tcc gcg aac	288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn	
65 70 75	
aca gcc tac atg gag ttg agg agc ctc aga tct gca gac acg gct gtt	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val	
80 85 90	

tat tat tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc

414

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

【0 2 9 0】

<210> 61

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "j" of humanized H chain V region

<400> 61

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

【 0 2 9 1 】

<210> 62

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F2MPS

<400> 62

ttctatgcat tgggtgcgcc aggctccagg acagggcctg gagggaatga 60
tcctgcgaat ggccattct 79

【 0 2 9 2 】

<210> 63

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F2MPA

<400> 63

agaatggcca ttcgcaggat cattccctcc catccactcc aggccctgtc ctggagcctg 60
gcgcacccaa tgcataagaa 79

【 0 2 9 3 】

<210> 64

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "b1" of humanized H chain V region

<400> 64

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg	48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly	
-15 -10 -5	
gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg	96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg	
1 5 10	
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att	144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile	
15 20 25	
aaa gac tac tat atg cat tgg gtg cgc cag gct cca gga cag ggc ctg	192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
gag tgg atg gga ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac	240
Glu Trp Met Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp	
50 55 60	
ccg aaa ttc cag ggc cga gtc aca atc act gca gac aca tcc acg aac	288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn	
65 70 75	
aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac aca gcc att	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile	
80 85 90	

tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc

414

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

【 0 2 9 4 】

<210> 65

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "b1" of humanized H chain V region

<400> 65

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

【0 2 9 5】

<210> 66

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "d1" of humanized H chain V region

<400> 66

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gtg cgc cag gct cca gga cag ggc ctg 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

gag tgg atg gga ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240
Glu Trp Met Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50 55 60

ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att act gcg gac gaa tcc acg agc 288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser

65 70 75

aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac tcg gcc gta 336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val

80 85 90

tat ttc tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384
Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95 100 105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110 115

【0 2 9 6】

<210> 67

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "d1" of humanized H chain V region

<400> 67

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

[0 2 9 7]

<210> 68

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F2VHS

<400> 68

ttctatgcat tgggtgacgac aggcccttg acaagggtt gagtggattg gaggggaatga 60

tcctgcgaat ggccatctt 79

[0 2 9 8]

<210> 69

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F2VHA

<400> 69

aagatggcca ttgcaggat cattccctcc aatccactca agcccttgctc caggggcctg 60

tcgcacccaa tgcatagaa

【 0 2 9 9 】

<210> 70

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "b3" of humanized H chain V region

<400> 70

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

gag tgg att gga ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50 55 60

ccg aaa ttc cag ggc cga gtc aca atc act gca gac aca tcc acg aac 288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn

65 70 75

aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac aca gcc att 336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile

80 85 90

tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95 100 105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110 115

【0 3 0 0】

<210> 71

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "b3" of humanized H chain V region

<400> 71

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

[0 3 0 1]

<210> 72

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "d3" of humanized H chain V region

<400> 72

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg	96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg	
1 5 10	
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att	144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile	
15 20 25	
aaa gac tac tat atg cat tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt	192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
gag tgg att gga ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac	240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp	
50 55 60	
ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att act gcg gac gaa tcc acg agc	288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser	
65 70 75	
aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac tcg gcc gta	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val	
80 85 90	
tat ttc tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa	384
Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln	
95 100 105	
ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc	414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser	

110 115

【0 3 0 2】

<210> 73

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "d3" of humanized H chain V region

<400> 73

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

【 0 3 0 3 】

<210> 74

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling vector Lv1S

<400> 74

gtctagatct ccacatgag ggcccctgct cagttttttg ggatcttggt gctctggtt 60

ccagggatcc gatgtgacat ccagatgacc cagtctcc 98

【 0 3 0 4 】

<210> 75

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling vector h5Lv4S

<400> 75

ttggcagatg ggggtcccatc aaggttcagt ggctccggat ctggtaccga tttcactctc 60
accatctcga gtctgcaacc tgaagatttt gcaactta 98

【 0 3 0 5 】

<210> 76

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling vector h5Lv2A

<400> 76

cttaagaagc ttttaatgtc ctgtgaggcc ttgcacgtga tgggtactct gtctcctaca 60
gatgcagaca gggaggatgg agactgggtc atctggat 98

【 0 3 0 6 】

<210> 77

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling vector h5Lv3A

<400> 77

gatgggaccc catctgccaa actagttgca taatagatca ggagcttagg ggctttccct 60

ggtttctgct gataccaact taagaagctt ttaatgtc

98

【 0 3 0 7 】

<210> 78

<211> 94

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling vector h5Lv5A

<400> 78

tgttcgtacg tttgatctcc accttggtcc ctccgccgaa cgtgtacggg ctctcaccat 60

gctgcagaca gtagtaagtt gcaaaatctt cagg 94

【 0 3 0 8 】

<210> 79

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer h5LvS

<400> 79

gtctagatct ccaccatgag 20

【 0 3 0 9 】

<210> 80

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer h5LvA

<400> 80

tgttcgtacg tttgatctc 19

【0 3 1 0】

<210> 81

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(60)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (61)...(381)

<223> Nucleotide sequence coding for version "a" of humanized L chain V region

<400> 81

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca 48

Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro

-20 -15 -10 -5

ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct 96

Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

1 5 10

gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac 144

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp

15 20 25

att aaa agc ttc tta agt tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct 192

Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

30 35 40

aag ctc ctg atc tat tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca 240

Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser

45 50 55 60

agg ttc agt ggc tcc gga tct ggt acc gat ttc act ctc acc atc tcg 288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75

agt ctg caa cct gaa gat ttt gca act tac tac tgt ctg cag cat ggt 336
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly

80 85 90

gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 381
Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

95 100 105

【0 3 1 1】

<210> 82

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "a" of humanized L chain V region

<400> 82

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe

20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

【 0 3 1 2 】

<210> 83

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F3SS

<400> 83

gtctgtgtagc gattacactc tcaccatctc gagcctccag cctgaagatt ttgcaactta 60
ctattgtctg cagaaca 77

【 0 3 1 3 】

<210> 84

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F3SA

<400> 84

tgttctgcag acaatagtaa gttgcaaaat cttcaggctg gaggctcgag atggtgagag 60
tgtaatcggt accagac 77

【 0 3 1 4 】

<210> 85

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F3RS

<400> 85

gtctggtacc gattacactc tcaccatctc gagcctccag cctgaagata ttgcaactta 60
ctattgtctg cagaaca 77

【0 3 1 5】

<210> 86

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F3RA

<400> 86

tgttctgcag acaatagtaa gttgcaatat cttcaggctg gaggctcgag atggtgagag 60
tgtaatcggt accagac 77

【0 3 1 6】

<210> 87

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(60)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (61)...(381)

<223> Nucleotide sequence coding for version "b" of humanized L chain V
region

<400> 87

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca	48
Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro	
-20 -15 -10 -5	
ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct	96
Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser	
1 5 10	
gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac	144
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp	
15 20 25	
att aaa agc ttc tta agt tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct	192
Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro	
30 35 40	
aag ctc ctg atc tat tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca	240
Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser	
45 50 55 60	
agg ttc agt ggc tcc gga tct ggt acc gat tac act ctc acc atc tcg	288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser	
65 70 75	
agc ctc cag cct gaa gat ttt gca act tac tat tgt ctg cag cat ggt	336
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly	
80 85 90	
gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa	381
Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
95 100 105	

[0 3 1 7]

<210> 88

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "b" of humanized L chain V region

<400> 88

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

【0 3 1 8】

<210> 89

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(60)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (61)...(381)

<223> Nucleotide sequence coding for version "c" of humanized L chain V

region

<400> 89

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca	48
Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro	
-20 -15 -10 -5	
ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct	96
Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser	
1 5 10	
gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac	144
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp	
15 20 25	
att aaa agc ttc tta agt tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct	192
Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro	
30 35 40	
aag ctc ctg atc tat tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca	240
Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser	
45 50 55 60	
agg ttc agt ggc tcc gga tct ggt acc gat tac act ctc acc atc tcg	288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser	
65 70 75	
agc ctc cag cct gaa gat att gca act tac tat tgt ctg cag cat ggt	336
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly	
80 85 90	
gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa	381
Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
95 100 105	

【0 3 1 9】

<210> 90

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "c" of humanized L chain V region

<400> 90

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe

20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

[0 3 2 0]

<210> 91

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F2SS

<400> 91

gtctcttaag ttggttccag cagaaaccag ggaaatctcc taagaccctg atctactatg 60

caactagtaa ca 72

【 0 3 2 1 】

<210> 92

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F2SA

<400> 92

tggtactagt tgcatagtag atcagggctt taggagattt ccctgggttc tgctggaacc 60
aacttaagag ac 72

【 0 3 2 2 】

<210> 93

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F2XS

<400> 93

gtctcttaag ttggtatcag cagaaaccag agaaagcccc taagtcctg atctattatg 60
caactagtaa ca 72

【 0 3 2 3 】

<210> 94

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F2XA

<400> 94

tggtactagt tgcataatag atcagggact taggggcttt ctctgggttc tgctgatacc 60

aacttaagag ac

【 0 3 2 4 】

<210> 95

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(60)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (61)...(381)

<223> Nucleotide sequence coding for version "b1" of humanized L chain V region

<400> 95

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca 48

Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro

-20 -15 -10 -5

ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct 96

Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

1 5 10

gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac 144

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp

15 20 25

att aaa agc ttc tta agt tgg ttc cag cag aaa cca ggg aaa tct cct 192

Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro

30 35 40

aag acc ctg atc tac tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca 240

Lys Thr Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser

45 50 55 60

agg ttc agt ggc tcc gga tct ggt acc gat tac act ctc acc atc tcg 288

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75

agc ctc cag cct gaa gat ttt gca act tac tat tgt ctg cag cat ggt 336

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly

80 85 90

gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 381

Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

95 100 105

【 0 3 2 5 】

<210> 96

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "b1" of humanized L chain V region

<400> 96

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe

20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

【0 3 2 6】

<210> 97

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(60)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (61)...(381)

<223> Nucleotide sequence coding for version "b2" of humanized L chain V
 region

<400> 97

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca 48
 Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro
 -20 -15 -10 -5
 ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct 96
 Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 1 5 10
 gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac 144
 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
 15 20 25

att aaa agc ttc tta agt tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct 192

Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro

30

35

40

aag tcc ctg atc tat tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca 240

Lys Ser Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser

45

50

55

60

agg ttc agt ggc tcc gga tct ggt acc gat tac act ctc acc atc tcg 288

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser

65

70

75

agc ctc cag cct gaa gat ttt gca act tac tat tgt ctg cag cat ggt 336

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly

80

85

90

gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 381

Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

95

100

105

【 0 3 2 7 】

<210> 98

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "b2" of humanized L chain V region

<400> 98

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe

20

25

30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35

40

45

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

[0 3 2 8]

<210> 99

<211> 117

<212> PRT

<213> Mouse

<220>

<223> Amino acid sequence of H chain V region of anti TF mouse monoclonal antibody ATR-5

<400> 99

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Asn Leu Val Arg Pro Gly Ala
5 10 15

Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Ser Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser

115

【 0 3 2 9 】

<210> 100

<211> 107

<212> PRT

<213> Mouse

<220>

<223> Amino acid sequence of L chain V region of anti TF mouse monoclonal antibody ATR-5

<400> 100

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly

5

10

15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe

20

25

30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Trp Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile

35

40

45

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Asn Leu Glu Ser

65

70

75

80

Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

【 0 3 3 0 】

<210> 101

<211> 780

<212> DNA

<213> Homosapiens

<220>

<223> DNA coding for soluble human TF

<400> 101

atg gag acc cct gcc tgg ccc cgg gtc ccg cgc ccc gag acc gcc gtc	48
Met Glu Thr Pro Ala Trp Pro Arg Val Pro Arg Pro Glu Thr Ala Val	
-30 -25 -20	
gct cgg acg ctc ctg ctc ggc tgg gtc ttc gcc cag gtg gcc ggc gct	96
Ala Arg Thr Leu Leu Leu Gly Trp Val Phe Ala Gln Val Ala Gly Ala	
-15 -10 -5 -1	
tca ggc act aca aat act gtg gca gca tat aat tta act tgg aaa tca	144
Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser	
1 5 10 15	
act aat ttc aag aca att ttg gag tgg gaa ccc aaa ccc gtc aat caa	192
Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln	
20 25 30	
gtc tac act gtt caa ata agc act aag tca gga gat tgg aaa agc aaa	240
Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys	
35 40 45	
tgc ttt tac aca aca gac aca gag tgt gac ctc acc gac gag att gtg	288
Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val	
50 55 60	
aag gat gtg aag cag acg tac ttg gca cgg gtc ttc tcc tac ccg gca	366
Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala	
65 70 75 80	

ggg aat gtg gag agc acc ggt tct gct ggg gag cct ctg tat gag aac	384
Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn	
85 90 95	
tcc cca gag ttc aca cct tac ctg gag aca aac ctc gga cag cca aca	432
Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr	
100 105 110	
att cag agt ttt gaa cag gtg gga aca aaa gtg aat gtg acc gta gaa	480
Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu	
115 120 125	
gat gaa cgg act tta gtc aga agg aac aac act ttc cta agc ctc cgg	528
Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg	
130 135 140	
gat gtt ttt ggc aag gac tta att tat aca ctt tat tat tgg aaa tct	576
Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser	
145 150 155 160	
tca agt tca gga aag aaa aca gcc aaa aca aac act aat gag ttt ttg	624
Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu	
165 170 175	
att gat gtg gat aaa gga gaa aac tac tgt ttc agt gtt caa gca gtg	672
Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val	
180 185 190	
att ccc tcc cga aca gtt aac cgg aag agt aca gac agc ccg gta gag	720
Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu	
195 200 205	
tgt atg ggc cag gag aaa ggg gaa ttc aga gaa gac tac aaa gac gat	768
Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Asp Tyr Lys Asp Asp	
210 215 220	

gac gat aaa taa

Asp Asp Lys

225

【0 3 3 1】

<210> 102

<211> 259

<212> PRT

<220>

<223> Amino acid sequence of soluble human TF

<400> 102

Met Glu Thr Pro Ala Trp Pro Arg Val Pro Arg Pro Glu Thr Ala Val

-30

-25

-20

Ala Arg Thr Leu Leu Leu Gly Trp Val Phe Ala Gln Val Ala Gly Ala

-15

-10

-5

-1

Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser

1

5

10

15

Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln

20

25

30

Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys

35

40

45

Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val

50

55

60

Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala

65

70

75

80

Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn

85

90

95

Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr

100

105

110

Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu

115

120

125

Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg

130

135

140

Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser

145

150

155

160

Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu

165

170

175

Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val

180

185

190

Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu

195

200

205

Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Asp Tyr Lys Asp Asp

210

215

220

Asp Asp Lys

225

【 0 3 3 2 】

<210> 103

<211> 780

<212> DNA

<213> Homosapiens

<220>

<223> DNA coding for human TF

<400> 103

atg gag acc cct gcc tgg ccc cgg gtc ccg cgc ccc gag acc gcc gtc 48

MET Glu Thr Pro Ala Trp Pro Arg Val Pro Arg Pro Glu Thr Ala Val

-30

-25

-20

gct cgg acg ctc ctg ctc ggc tgg gtc ttc gcc cag gtg gcc ggc gct	96
Ala Arg Thr Leu Leu Leu Gly Trp Val Phe Ala Gln Val Ala Gly Ala	
-15 -10 -5 -1	
tca ggc act aca aat act gtg gca gca tat aat tta act tgg aaa tca	144
Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser	
1 5 10 15	
act aat ttc aag aca att ttg gag tgg gaa ccc aaa ccc gtc aat caa	192
Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln	
20 25 30	
gtc tac act gtt caa ata agc act aag tca gga gat tgg aaa agc aaa	240
Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys	
35 40 45	
tgc ttt tac aca aca gac aca gag tgt gac ctc acc gac gag att gtg	288
Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val	
50 55 60	
aag gat gtg aag cag acg tac ttg gca cgg gtc ttc tcc tac ccg gca	336
Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala	
65 70 75 80	
ggg aat gtg gag agc acc ggt tct gct ggg gag cct ctg tat gag aac	384
Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn	
85 90 95	
tcc cca gag ttc aca cct tac ctg gag aca aac ctc gga cag cca aca	432
Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr	
100 105 110	
att cag agt ttt gaa cag gtg gga aca aaa gtg aat gtg acc gta gaa	480
Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu	
115 120 125	

gat gaa cgg act tta gtc aga agg aac aac act ttc cta agc ctc cgg	528
Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg	
130 135 140	
gat gtt ttt ggc aag gac tta att tat aca ctt tat tat tgg aaa tct	576
Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser	
145 150 155 160	
tca agt tca gga aag aaa aca gcc aaa aca aac act aat gag ttt ttg	624
Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu	
165 170 175	
att gat gtg gat aaa gga gaa aac tac tgt ttc agt gtt caa gca gtg	672
Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val	
180 185 190	
att ccc tcc cga aca gtt aac cgg aag agt aca gac agc ccg gta gag	720
Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu	
195 200 205	
tgt atg ggc cag gag aaa ggg gaa ttc aga gaa ata ttc tac atc att	768
Cys MET Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Ile Phe Tyr Ile Ile	
210 215 220	
gga gct gtg gta ttt gtg gtc atc atc ctt gtc atc atc ctg gct ata	816
Gly Ala Val Val Phe Val Val Ile Ile Leu Val Ile Ile Leu Ala Ile	
225 230 235 240	
tct cta cac aag tgt aga aag gca gga gtg ggg cag agc tgg aag gag	864
Ser Leu His Lys Cys Arg Lys Ala Gly Val Gly Gln Ser Trp Lys Glu	
245 250 255	
aac tcc cca ctg aat gtt tca taa	888
Asn Ser Pro Leu Asn Val Ser ***	

260

【0 3 3 3】

<210> 104

<211> 259

<212> PRT

<220>

<223> Amino acid sequence of soluble human TF

<400> 104

MET Glu Thr Pro Ala Trp Pro Arg Val Pro Arg Pro Glu Thr Ala Val

-30

-25

-20

Ala Arg Thr Leu Leu Leu Gly Trp Val Phe Ala Gln Val Ala Gly Ala

-15

-10

-5

-1

Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser

1

5

10

15

Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln

20

25

30

Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys

35

40

45

Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val

50

55

60

Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala

65

70

75

80

Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn

85

90

95

Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr

100

105

110

Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu

115

120

125

Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg

130

135

140

Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser

145

150

155

160

Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu
 165 170 175
 Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val
 180 185 190
 Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu
 195 200 205
 Cys MET Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Ile Phe Tyr Ile Ile
 210 215 220
 Gly Ala Val Val Phe Val Val Ile Ile Leu Val Ile Ile Leu Ala Ile
 225 230 235 240
 Ser Leu His Lys Cys Arg Lys Ala Gly Val Gly Gln Ser Trp Lys Glu
 245 250 255
 Asn Ser Pro Leu Asn Val Ser
 260

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョン b／L鎖ヒト型化バージョン b 抗体、H鎖ヒト型化バージョン i／L鎖ヒト型化バージョン b 抗体、及びH鎖ヒト型化バージョン i／L鎖ヒト型化バージョン b 2 抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

【図 2】

図 2 は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョン b／L鎖ヒト型化バージョン b 抗体、H鎖ヒト型化バージョン i／L鎖ヒト型化バージョン b 抗体、及びH鎖ヒト型化バージョン i／L鎖ヒト型化バージョン b 2 抗体の、ヒト T F に対する中和活性（T F のファクター X a 産生阻害活性）を比較したグラフである。

【図 3】

図 3 は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョン b／L鎖ヒト型化バージョン b 抗体、H鎖ヒト型化バージョン i／L鎖ヒト型化バージョン b 抗体、及びH鎖ヒト型化バージョン i／L鎖ヒト型化バージョン b 2 抗体の、ヒト T F に対する中和活性（ファクター X 結合阻害活性）を比較したグラフである。

【図 4】

図 4 は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョン b／L鎖ヒト型化バージョン b 抗体、H鎖ヒト型化バージョン i／L鎖ヒト型化バージョン b 抗体、及びH鎖ヒト型化バージョン i／L鎖ヒト型化バージョン b 2 抗体の、ヒト T F に対する中和活性（T F の血漿凝固阻害活性）を比較したグラフである。

【図 5】

図 5 は、ヒト組織因子遺伝子が導入された細胞を移植したマウス（点線）及び該遺伝子が導入されていない細胞を移植したマウス（実線）における腫瘍体積の、腫瘍細胞移植後の経時変化を示すグラフである。

【図 6】

図 6 は、ヒト組織因子遺伝子が導入された細胞を移植したマウス（点線）及び

該遺伝子が導入されていない細胞を移植したマウス（実線）における、ヒト組織因子の血中濃度の、腫瘍細胞移植後の経時変化を示すグラフである。

【図 7】

図 7 は、ヒト組織因子遺伝子が導入された細胞を移植したマウス（点線）及び該遺伝子が導入されていない細胞を移植したマウス（実線）における、血小板の数の、腫瘍細胞移植後の経時変化を示すグラフである。

【図 8】

図 8 は、ヒト組織因子遺伝子が導入された細胞を移植したマウス（点線）及び該遺伝子が導入されていない細胞を移植したマウス（実線）における、フィブリノーゲンの血中濃度の、腫瘍細胞移植後の経時変化を、腫瘍細胞を移植してない対照マウス（Normal）におけるフィブリノーゲンの濃度を 100%とした相対値として示すグラフである。

【図 9】

図 9 は、ヒト組織因子遺伝子が導入された細胞を移植したマウス（点線）及び該遺伝子が導入されていない細胞を移植したマウス（実線）における、可溶性フィブリンモノマー複合体（sFMC）の血中濃度の、腫瘍細胞移植後の経時変化を示すグラフである。

【図 10】

図 10 は、ヒト組織因子遺伝子が導入された細胞を移植したマウス（点線）及び該遺伝子が導入されていない細胞を移植したマウス（実線）における、トロンビン-アンチトロンビン III 結合複合体（TAT）の血中濃度の、腫瘍細胞移植後の経時変化を示すグラフである。

【図 11】

図 11 は、ヒトTF遺伝子を導入した腫瘍細胞を移植したマウスに、移植45日目から抗ヒトTF抗体を1mg/kgで週1回、3週間にわたって投与した場合の血小板数の経時的変化を示すグラフである。

【図 12】

図 12 は、ヒトTF遺伝子を導入した腫瘍細胞を移植したマウスに、移植45日目から抗ヒトTF抗体を1mg/kgで週1回、3週間にわたって投与した場合の、最終投

与の6日後のフィブリンモノマー複合体 (sFMC) の血中濃度を示すグラフである。

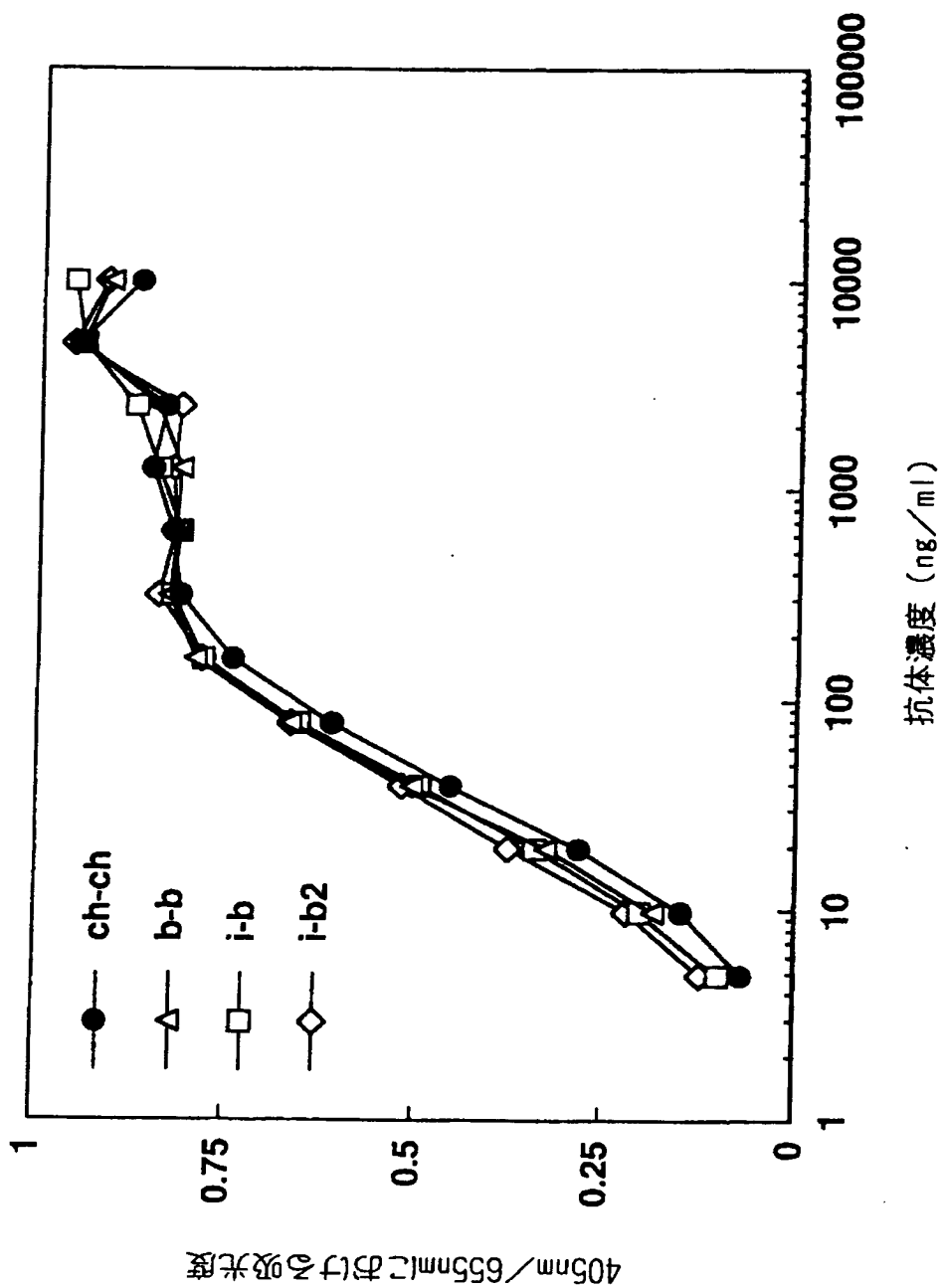
【図 13】

図 13 は、ヒトTF遺伝子を導入した腫瘍細胞を移植したマウスに、移植45日目から抗ヒトTF抗体を1mg/kgで週1回、3週間にわたって投与した場合の、最終投与の6日後のトロンビン-アンチトロンビンIII 複合体 (TAT) の血中濃度を示すグラフである。

【書類名】 図面

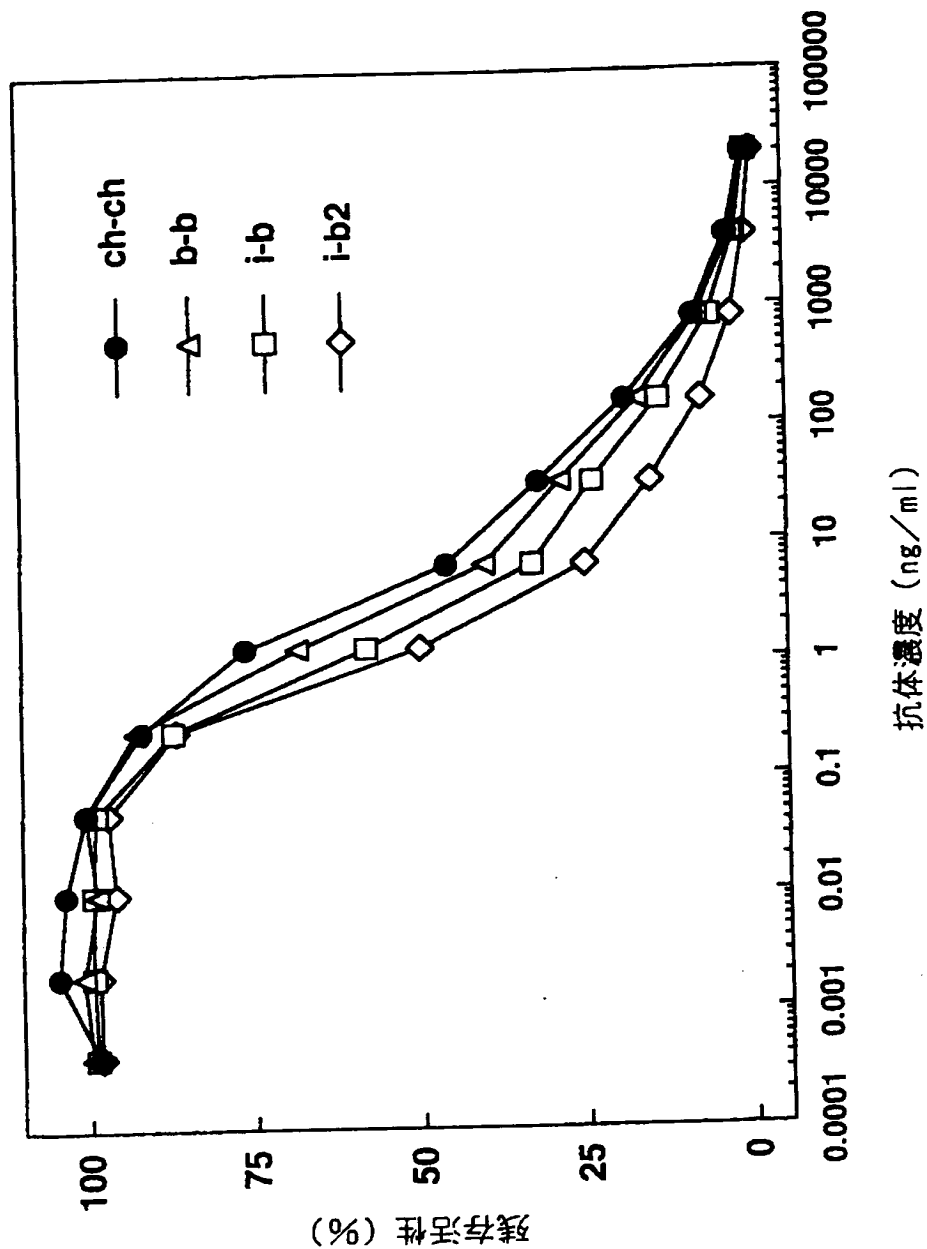
【図 1】

図 1



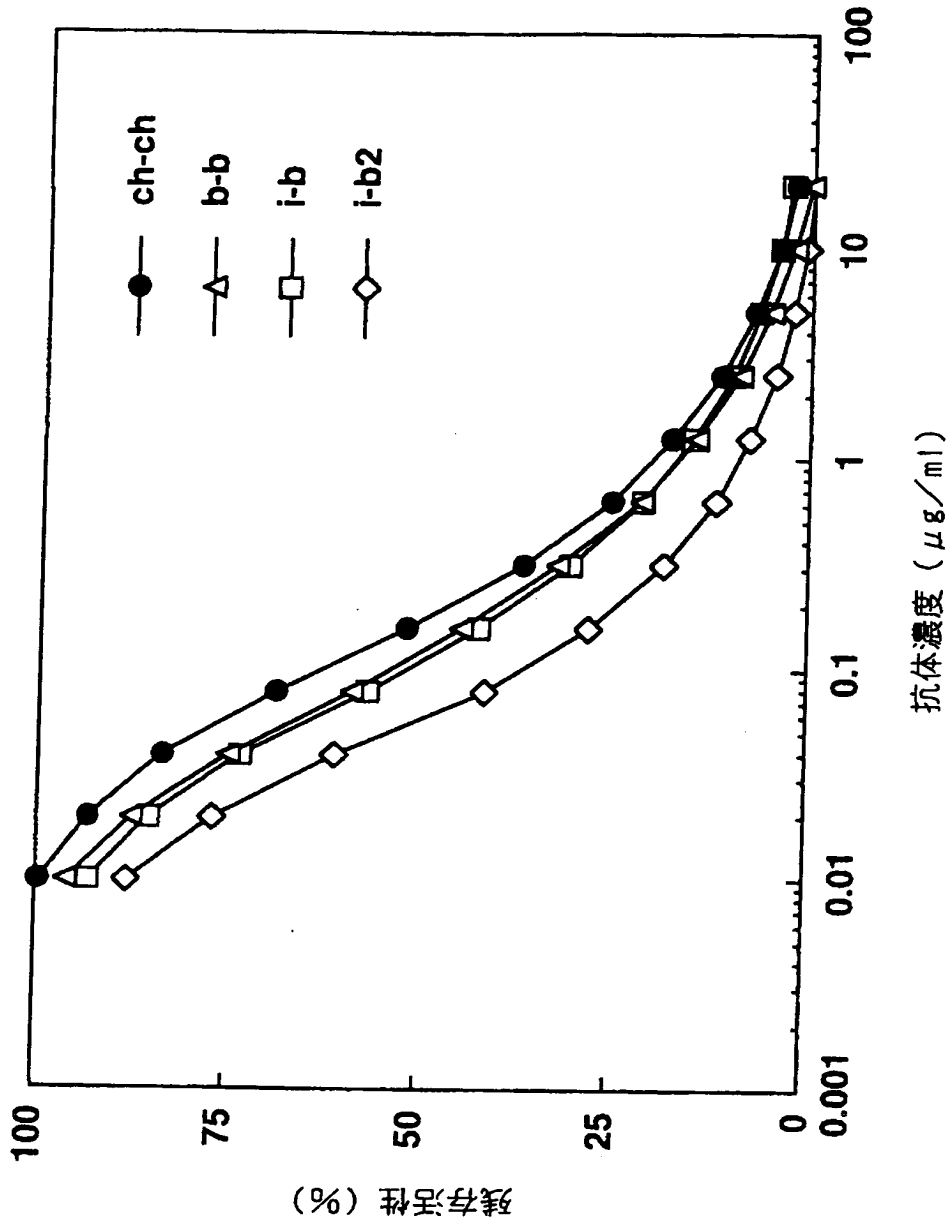
【图 2】

图 2



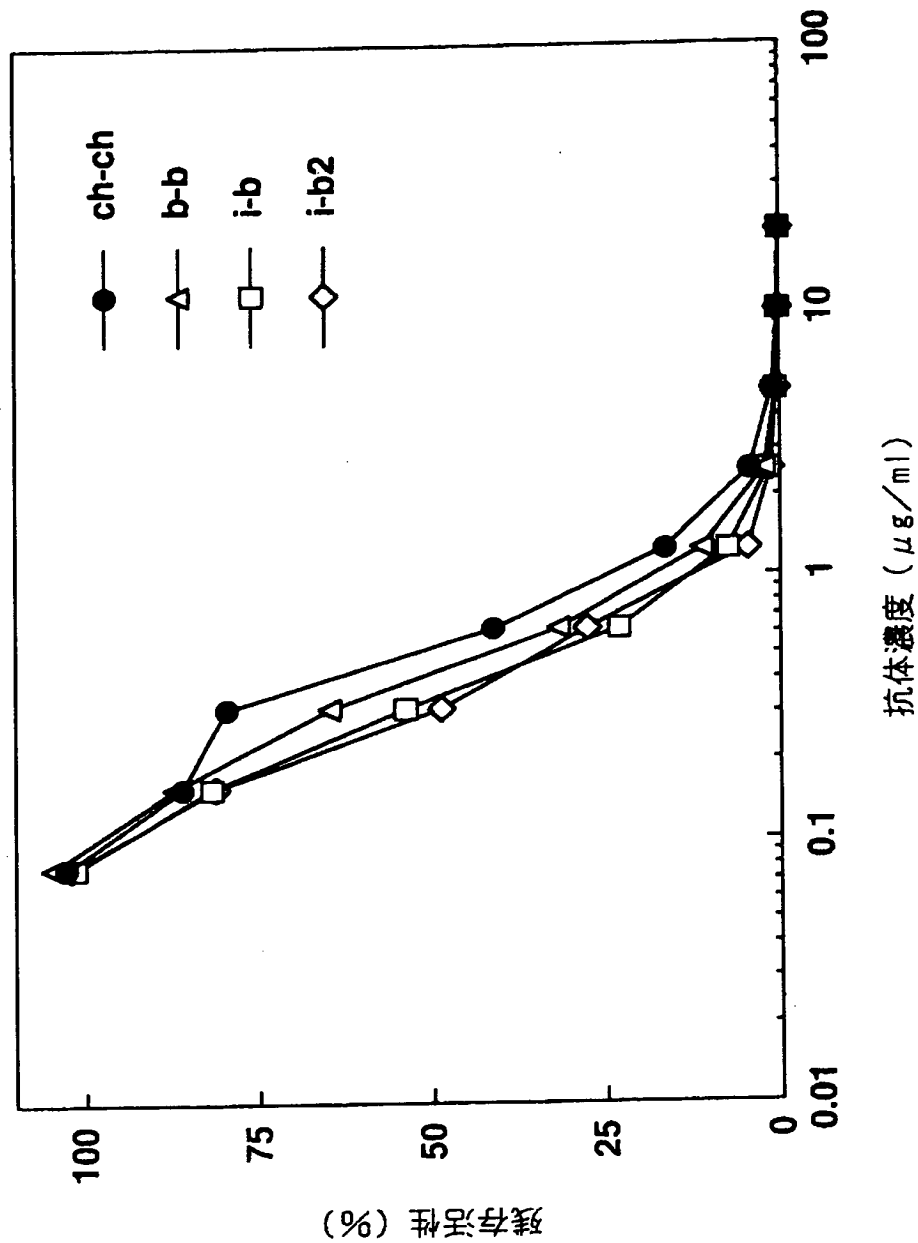
【図 3】

図 3

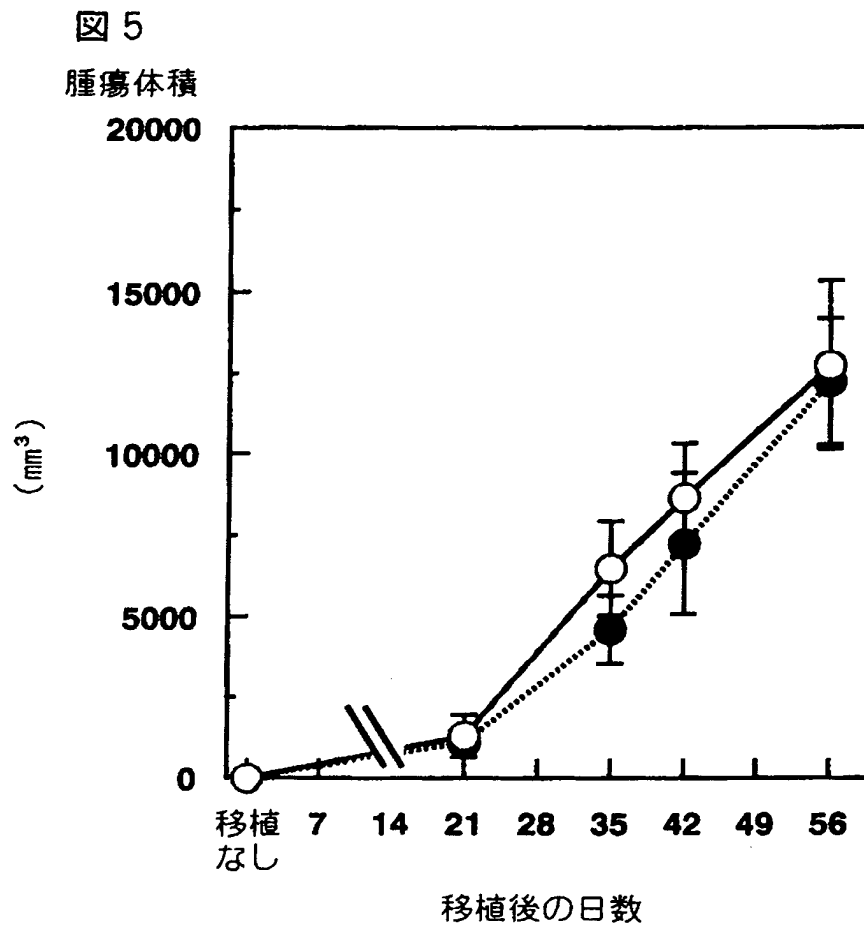


【図4】

図4



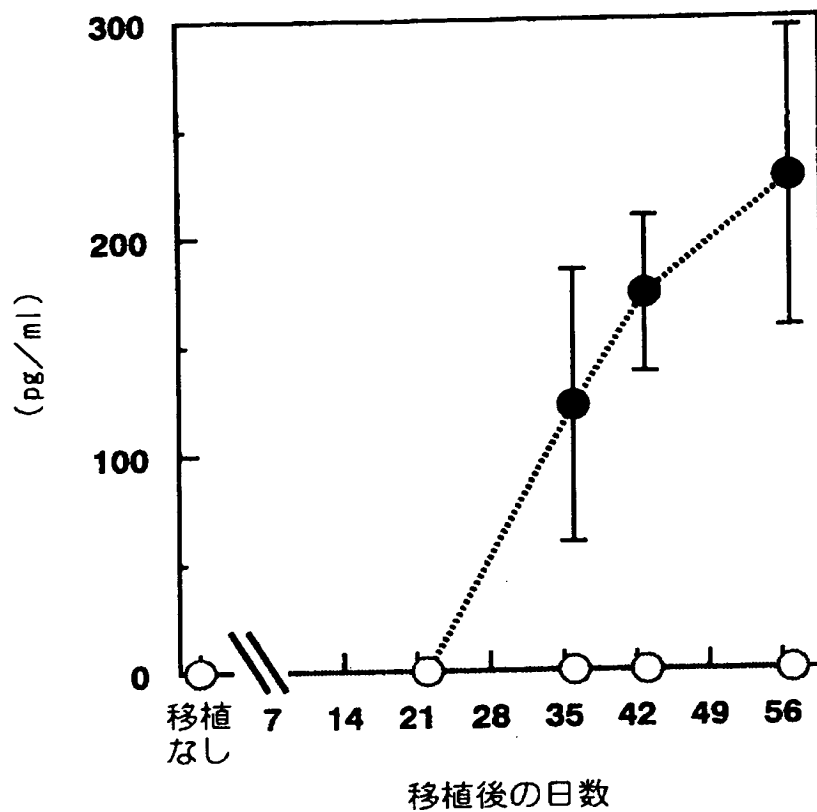
【図 5】



【図 6】

図 6

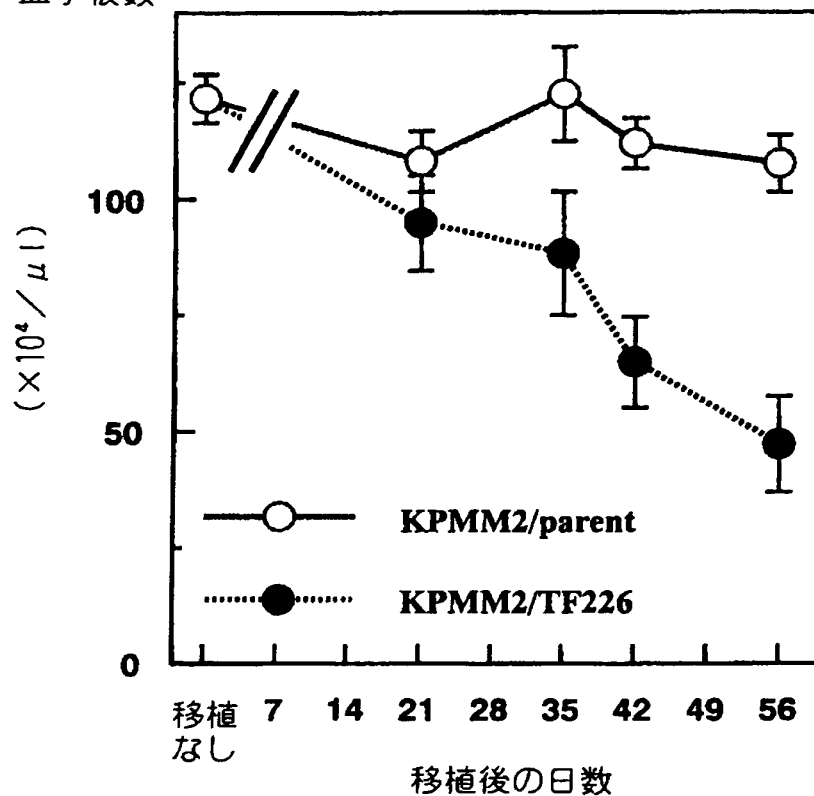
hTF 濃度



【図 7】

図 7

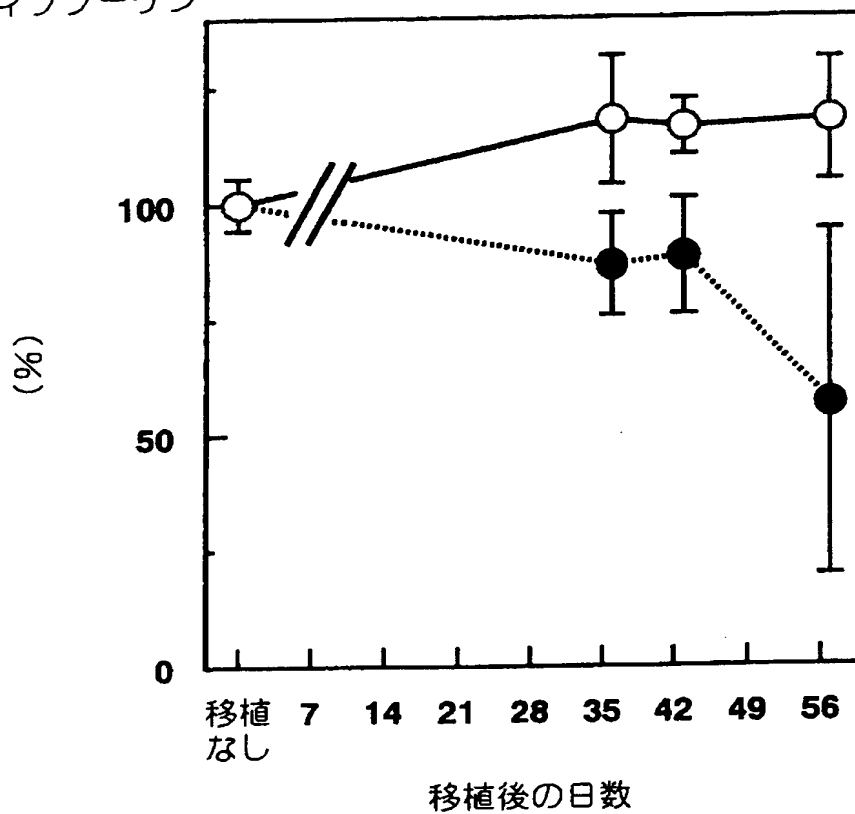
血小板数



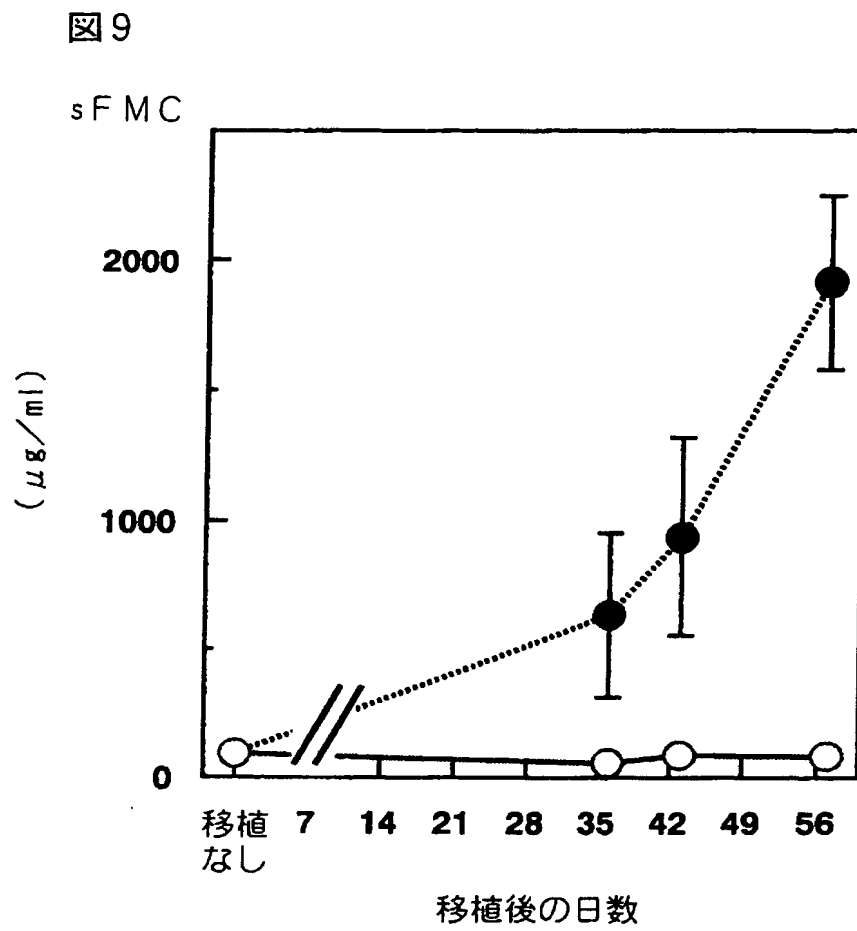
【図 8】

図 8

フィブノーゲン

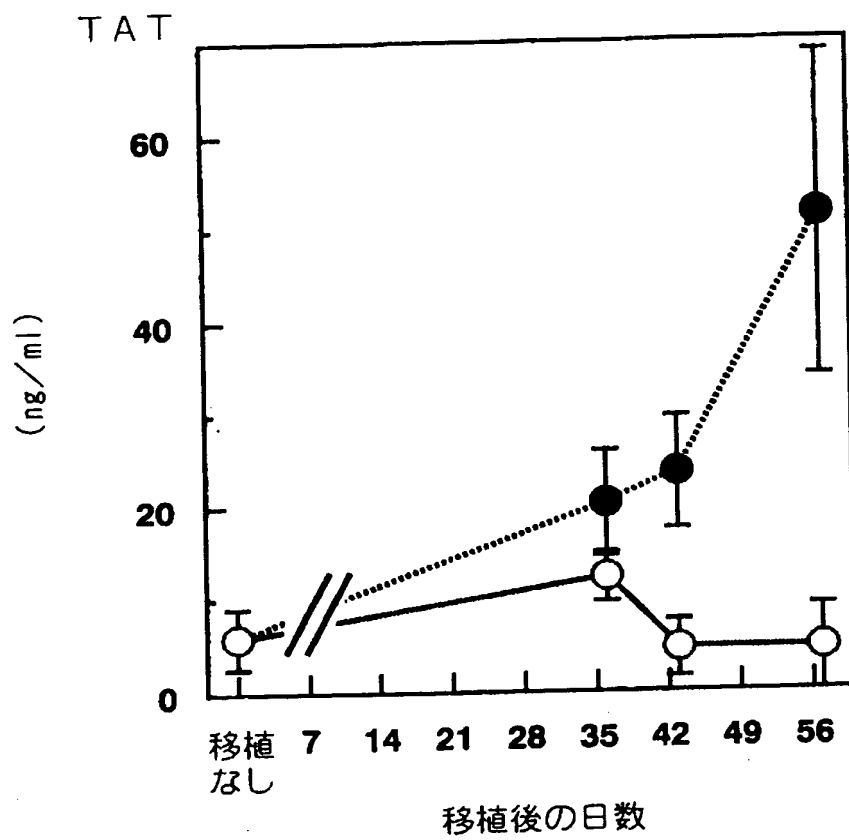


【図9】



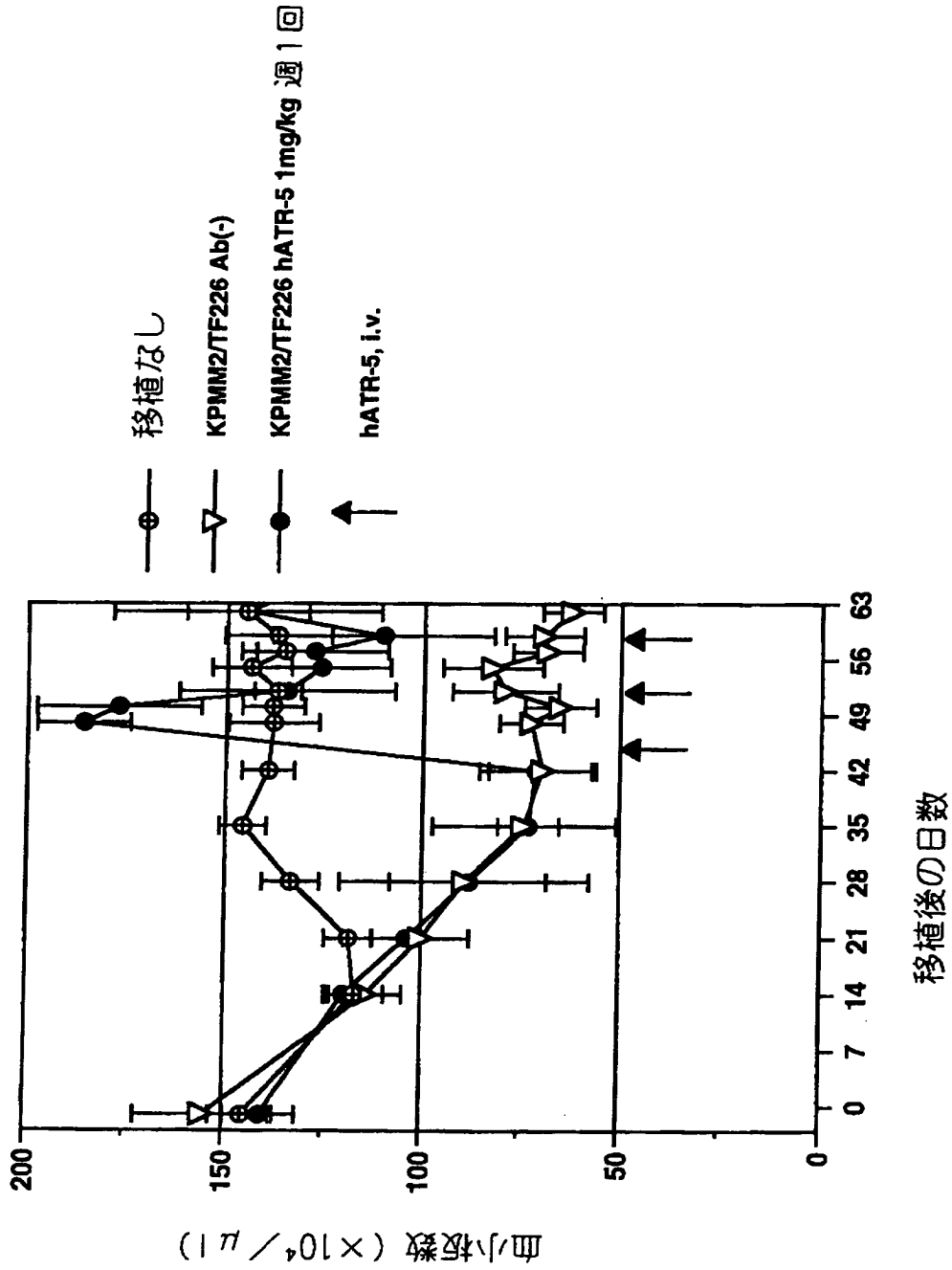
【図 10】

図 10



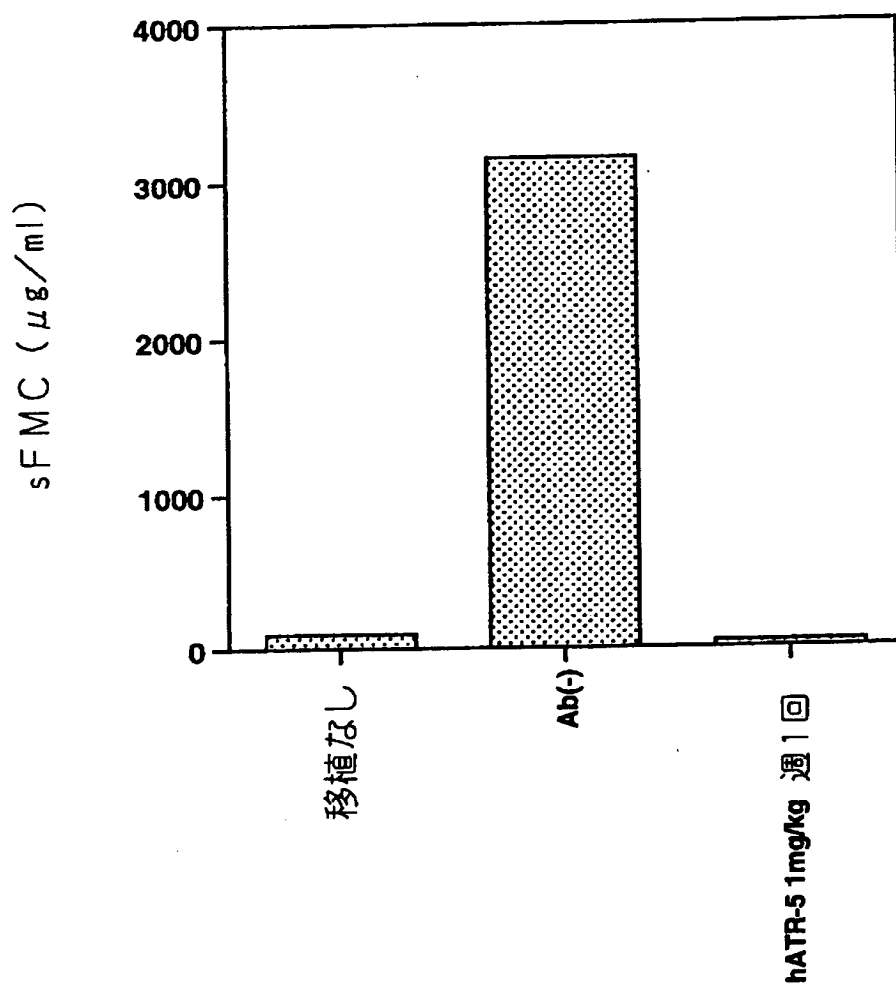
【図 11】

図 11



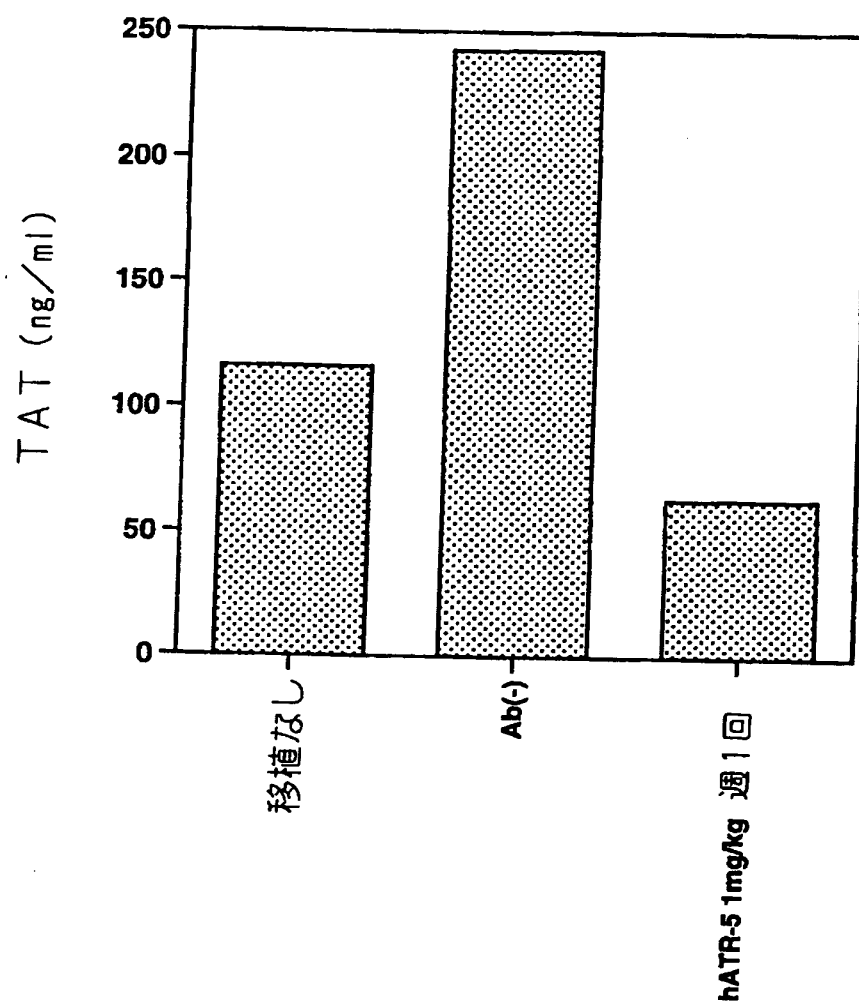
【図 12】

図 12



【図 13】

図 13



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 血液凝固亢進状態が持続している疾患の予防又は治療剤の提供。

【解決手段】 ヒト組織因子（ヒト T F）に対する抗体を含んで成る、血液凝固亢進状態が持続している疾患の予防又は治療剤。

【選択図】 図 1 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000003311]

1. 変更年月日 1990年 9月 5日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都北区浮間5丁目5番1号
氏 名 中外製薬株式会社